

**Risiko-Locus für koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt
auf Chromosom 9p21.3:
genomweites Genexpressionsprofil in humanen Makrophagen**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
CHRISTA ZOLLBRECHT

aus
Neumarkt

im Jahr 2012

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Christian Hengstenberg

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 17.10.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

Unterschrift:

| | | |
|--------------------|------------------|----------------------------------|
| Prüfungsausschuss: | Vorsitzender | Prof. Dr. Thomas Dresselhaus |
| | Erstgutachter | Prof. Dr. Christian Hengstenberg |
| | Zweitgutachterin | Prof. Dr. Anja Bosserhoff |
| | Drittprüfer | Prof. Dr. Herbert Tschochner |
| | Ersatzprüfer | Prof. Dr. Gernot Längst |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | IV |
| Tabellenverzeichnis..... | VI |
| Spezielle Abkürzungen der Arbeit..... | VII |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Atherosklerose..... | 1 |
| 1.2 Gene in der Umgebung des KHK Risiko-Locus auf Chromosom 9p21.3..... | 6 |
| 1.3 Verwendetes Modell: Makrophagen, atherogene Stimulierungen und genomweite..... Genexpression | 10 |
| 1.4 Zwei Mechanismen der Genregulation in Eukaryoten: alternatives Spleißen und..... DNA-Methylierung | 14 |
| 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit | 19 |
| 2 Material und Methoden | 20 |
| 2.1 Genotypisierung | 20 |
| 2.2 Patientenkollektiv..... | 20 |
| 2.3 PBMC-Isolierung, Stimulierung und Ernte der Zellen | 21 |
| 2.4 Negativ-Selektion von Monozyten aus PBMCs | 21 |
| 2.5 RNA-Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle..... | 22 |
| 2.6 RNA-Prozessierung und Array Hybridisierung | 22 |
| 2.7 Datenverarbeitung und statistische Analyse | 24 |
| 2.7.1 Datenverarbeitung und Qualitätskontrolle..... | 24 |
| 2.7.2 Statistische Verfahren | 28 |
| 2.8 Technische Validierung mittels quantitativer PCR..... | 30 |
| 2.8.1 cDNA-Synthese..... | 30 |
| 2.8.2 Durchführung und Auswertung der qPCR | 31 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.9 | Zusammenstellung aller erhobenen Expressionsdaten | 33 |
| 2.10 | 5'- <i>rapid amplification of cDNA ends</i> (RACE) | 33 |
| 2.10.1 | cDNA-Synthese..... | 34 |
| 2.10.2 | PCR-Amplifizierung | 34 |
| 2.10.3 | Klonierung und Sequenzierung | 35 |
| 2.11 | <i>In silico</i> Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindestellen | 36 |
| 2.12 | Analyse des Methylierungsmusters genomischer DNA (EpiTYPER)..... | 36 |
| 2.12.1 | Isolierung genomischer DNA aus Monozyten | 37 |
| 2.12.2 | Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA..... | 38 |
| 2.12.3 | PCR-Amplifikation | 38 |
| 2.12.4 | In vitro Transkription und T-spezifische Spaltung mit RNase A | 40 |
| 2.12.5 | Transfer auf einen SpectroCHIP und massenspektrometrische Analyse | 40 |
| 2.12.6 | Analyse der Methylierungsdaten | 40 |
| 3 | Ergebnisse..... | 41 |
| 3.1 | Studienteilnehmer und Baseline Charakteristika | 41 |
| 3.2 | Genomweites Expressionsprofil von Makrophagen stratifiziert nach 9p21.3..... Haplotypen | 45 |
| 3.3 | Stimulierung der Makrophagen mit 9cRA und T0901317 | 46 |
| 3.4 | Stimulierung der Makrophagen mit IFN γ und LPS | 47 |
| 3.5 | Unterschiedliche Reaktion der Makrophagen auf atherogene Stimulierung..... aufgrund des 9p21.3 Haplotyps | 49 |
| 3.5.1 | Mit 9cRA-T0901317 behandelte Makrophagen | 49 |
| 3.5.2 | Mit IFN γ -LPS behandelte Makrophagen..... | 54 |
| 3.6 | Validierung ausgewählter Gene | 57 |
| 3.7 | Alternatives Spleißen..... | 60 |
| 3.8 | Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 | 65 |
| 3.9 | Transkriptionsstart und Promotor von <i>CDKN2BAS</i> | 67 |
| 3.10 | Epigenetik – DNA-Methylierung auf Chromosom 9p21.3 | 69 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 4 | Diskussion | 75 |
| 4.1 | Genomweite Genexpression humaner Makrophagen in Abhängigkeit des 9p21.3..... KHK Risiko-Locus..... | 75 |
| 4.2 | Expression und Regulation der Gene im 9p21.3 KHK Risiko-Locus | 83 |
| 4.3 | KHK und HI: komplexe Phänotypen – komplexe Mechanismen..... | 86 |
| 4.4 | Ausblick | 92 |
| 5 | Zusammenfassung | 94 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 95 |
| 7 | Anhang..... | 108 |
| | Danksagung | 113 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 114 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------------|---|----|
| Abbildung 1: | Initiierende Ereignisse in der Atherosklerose. | 2 |
| Abbildung 2: | Fortschreiten der atherosklerotischen Prozesse in der Gefäßwand. | 3 |
| Abbildung 3: | Ruptur eines Plaques und Thrombusbildung..... | 4 |
| Abbildung 4: | Manhattan-Plot der Ergebnisse der GWAS..... | 5 |
| Abbildung 5: | Überblick über den Chromosom 9p21.3 Locus. | 7 |
| Abbildung 6: | Verschiedene Arten des alternativen Spleißens..... | 16 |
| Abbildung 7: | RNA-Prozessierung und Array-Hybridisierung. | 23 |
| Abbildung 8: | Signalhistogramme der einzelnen Arrays..... | 25 |
| Abbildung 9: | Box-Plots der log-transformierten Intensitätswerte..... | 26 |
| Abbildung 10: | Box-Plots der log-transformierten Expressionswerte..... | 26 |
| Abbildung 11: | Hauptkomponentenanalyse der Expressionsdaten. | 27 |
| Abbildung 12: | Schematischer Ablauf der Analyse des DNA-Methylierungsmusters..... | 37 |
| Abbildung 13: | Amplikons für die Analyse des Methylierungsmusters..... | 39 |
| Abbildung 14: | Effekt der 9cRA-T0901317 Stimulierung auf die Genexpression in..... Makrophagen (HI-Patienten). | 46 |
| Abbildung 15: | Unterschiede des Effekts der 9cRA-T0901317 Stimulierung zwischen den..... beiden Haplotyp-Gruppen (HI-Patienten)..... | 47 |
| Abbildung 16: | Effekt der IFN γ -LPS Stimulierung auf die Genexpression in Makrophagen. . | 48 |
| Abbildung 17: | Unterschiede des Effekts der IFN γ -LPS Stimulierung zwischen den beiden.... Haplotyp-Gruppen. | 49 |
| Abbildung 18: | Haplotyp-spezifische Unterschiede in der Expressionsänderung in..... Makrophagen von HI-Patienten durch 9cRA-T0901317..... | 50 |
| Abbildung 19: | Haplotyp-spezifische Unterschiede in der Expressionsänderung in..... Makrophagen durch IFN γ -LPS. | 55 |
| Abbildung 20: | <i>Gene View</i> für das Gen <i>TNF</i> (HI-Patienten). | 60 |
| Abbildung 21: | Das Gen <i>TNF</i> mit Affymetrix <i>Transcript Cluster</i> und <i>Probeset</i> IDs im <i>UCSC</i> <i>Genome Browser</i> | 61 |
| Abbildung 22: | Expressionsprofile von <i>TNF</i> | 62 |
| Abbildung 23: | <i>Gene View</i> für das Gen <i>LY75</i> (HI-Patienten)..... | 63 |
| Abbildung 24: | Ausschnitt des Detektionsbereichs des <i>Transcript Clusters</i> 2583254 im..... <i>UCSC Genome Browser</i> | 64 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: 5'-Ende von <i>CDKN2BAS</i> nach RefSeq-Annotation im Vergleich zur 5'-RACE in Monozyten..... | 68 |
| Abbildung 26: Mittlerer Methylierungsstatus der untersuchten Amplikons..... | 71 |
| Abbildung 27: Amplikon ECAD9_5 mit Lage der CpGs und des SNPs rs10757278. | 74 |
| Abbildung 28: Modell der potenziellen (anti)atherogenen Wirkung der durch genomweite..... Genexpression gefundenen Gene bzgl. 9p21.3 Haplotypen im Makrophagen- Modell. | 82 |
| Abbildung 29: Primerpaare für die Amplifikation von <i>CDKN2BAS</i> mittels PCR. | 84 |
| Abbildung 30: Mögliche regulatorische Funktionsweisen von lncRNAs..... | 89 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabelle 1: | Verwendete Genexpressionsassays mit Applied Biosystems Assay ID | 31 |
| Tabelle 2: | Zusammenstellung aller erhobenen Expressionsdaten | 33 |
| Tabelle 3: | Primer für die PCR-Amplifizierung zur 5'-RACE von <i>CDKN2BAS</i> | 35 |
| Tabelle 4: | Amplikons für die Analyse des Methylierungsmusters | 39 |
| Tabelle 5: | Baseline Charakteristika der Studienteilnehmer | 42 |
| Tabelle 6: | Haplotyp-spezifische Expressionsunterschiede in unbehandelten Makrophagen von HI-Patienten mit Risiko-Haplotyp im Vergleich zur nicht-risiko Gruppe. | 45 |
| Tabelle 7: | Haplotyp-spezifischer Expressionsunterschied in mit 9cRA-T0901317..... behandelten Makrophagen von HI-Patienten mit Risiko-Haplotyp im Vergleich.... zu Trägern des nicht-risiko Haplotyps. | 47 |
| Tabelle 8: | Unterschiede in der Genexpressionsänderung zwischen risiko und nicht-risiko.... Haplotypen in mit 9cRA-T0901317 behandelten Makrophagen (HI-Patienten).51 | |
| Tabelle 9: | Signifikant angereicherte biologische Prozesse (GO-Analyse) aus Tabelle 8...53 | |
| Tabelle 10: | Unterschiede in der Expressionsänderung zwischen risiko und nicht-risiko..... Haplotyp-Gruppen in mit IFN γ -LPS behandelten Makrophagen | 56 |
| Tabelle 11: | Expressionsunterschiede in der Metallothionin (MT)-Genfamilie zwischen risiko... und nicht-risiko Haplotypen in mit IFN γ und LPS behandelten Makrophagen...57 | |
| Tabelle 12: | qPCR Validierung ausgewählter Gene | 59 |
| Tabelle 13: | Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 (Array-Daten) | 65 |
| Tabelle 14: | Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 (qPCR-Daten) | 66 |
| Tabelle 15: | Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Promotor von <i>CDKN2BAS</i> in Monozyten 69 | |
| Tabelle 16: | Mittlerer Methylierungsstatus der untersuchten Amplikons | 71 |
| Tabelle 17: | Mittlerer Methylierungsstatus der einzelnen CpGs | 72 |
| Tabelle 18: | Gene mit unterschiedlicher Reaktion auf die IFN γ -LPS Stimulierung von Makrophagen (Risiko Haplotyp-Gruppen im Vergleich zu nicht-risiko Gruppen) | 108 |

Spezielle Abkürzungen der Arbeit

| | |
|----------------|--|
| 9cRA | <i>9-cis retinoic acid</i> |
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| ANRIL | <i>antisense noncoding RNA in the INK4 locus</i> |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| ARF | <i>alternative reading frame</i> |
| BP | <i>branching point</i> |
| CCL | <i>chemokine (C-C motif) ligand</i> |
| CDKN2A | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| CDKN2B | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i> |
| CDKN2BAS | <i>CDKN2B antisense RNA</i> |
| CKI | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i> |
| CLEC4E | <i>C-type lectin domain family 4, member E</i> |
| CLEC5A | <i>C-type lectin domain family 5, member A</i> |
| Cp | <i>crossing point</i> |
| CpG | Cytosin-phosphatidyl-Guanin |
| CRP | C-reaktives Protein |
| EMR3 | <i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 3</i> |
| FC | <i>Fold Change</i> |
| FDR | <i>false discovery rate</i> |
| GO | <i>Gene Ontology</i> |
| GSP | Gen-spezifischer Primer |
| GWAS | <i>genome-wide association study</i> |
| HDL | <i>high-density Lipoprotein</i> |
| HI | Herzinfarkt |
| IFN γ | Interferon γ |
| IFN γ R | IFN γ -Rezeptor |
| IL | Interleukin |
| INK | <i>inhibitor of cyclin-dependent kinase</i> |
| iPS | induzierte pluripotente Stammzellen |
| JAK | Januskinase |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| LD | <i>linkage disequilibrium</i> |

| | |
|--------|---|
| LDL | <i>low-density</i> Lipoprotein |
| lncRNA | <i>long non-coding RNA</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LXR | Leber-X-Rezeptor |
| MACS | <i>magnetic cell separation</i> |
| MCP | <i>monocyte chemoattractant protein</i> |
| M-CSF | <i>macrophage colony-stimulating factor</i> |
| MT | Metallothionin |
| MTAP | <i>methylthioadenosine phosphorylase</i> |
| ncRNA | <i>non-coding RNA</i> |
| OR | <i>odds ratio</i> |
| oxLDL | oxidiertes <i>low-density</i> Lipoprotein |
| PBMCs | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PCA | <i>principal component analysis</i> |
| PcG | <i>Polycomb group</i> |
| PRC1 | <i>Polycomb repressive complex 1</i> |
| PRC2 | <i>Polycomb repressive complex 2</i> |
| pRB | Retinoblastom-Protein |
| qPCR | quantitative Real-Time PCR |
| RACE | <i>rapid amplification of cDNA ends</i> |
| RIN | <i>RNA integrity number</i> |
| RMA | <i>robust multiarray analysis</i> |
| RT | reverse Transkriptase |
| RXR | Retinoid-X-Rezeptor |
| SAP | <i>shrimp alkaline phosphatase</i> |
| SH2 | <i>src-homology 2</i> |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| snRNA | <i>small nuclear RNA</i> |
| snRNP | <i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i> |
| SS | Spleißstelle |
| ss | <i>single-stranded</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| TLR | <i>Toll-like</i> Rezeptoren |
| TNF | Tumornekrose-Faktor |
| UPM | Universal Primer A Mix |

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Atherosklerose

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und der Herzinfarkt (HI) stellen die führenden Erkrankungs- und Todesursachen der westlichen Welt dar (Lopez *et al.*, 2006). In den Vereinigten Staaten von Amerika waren im Jahr 2008 82,6 Millionen Menschen kardiovaskulär erkrankt (Roger *et al.*, 2012). Rund 16,3 Millionen Menschen waren von KHK betroffen. Etwa 7,9 Millionen US-Amerikaner erlitten einen Herzinfarkt, wobei die Mortalitätsrate bei 32,8 % lag. Laut Prognosen geht man davon aus, dass im Jahr 2030 etwa 40,5 % der amerikanischen Bevölkerung an einer kardiovaskulären Erkrankung leiden werden (Roger *et al.*, 2012). Auch in Deutschland führen diese Erkrankungen die Liste der häufigsten Todesursachen an. Laut des Statistischen Bundesamts starben im Jahr 2010 fast 73.000 Menschen an chronischer ischämischer Herzkrankheit und 55.500 an akutem Herzinfarkt.

Bei der KHK handelt es sich um eine chronische Erkrankung des Herzens, die durch atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien ausgelöst wird. Atherosklerose ist ein inflammatorischer Prozess, dessen Ursache in endothelialer Dysfunktion liegt (Ross, 1999). Diese kann verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel oxidiertes *low-density* Lipoprotein (oxLDL), freie Radikale oder auch genetische Veränderungen. Eine solche Schädigung des Endothels verändert dessen Eigenschaften und führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Proteinen und Wachstumsfaktoren (Lusis, 2000). Dies wiederum bewirkt eine gesteigerte Anheftung und Einwanderung von Monozyten in die Intima der Gefäßwand, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Diese Zellen exprimieren *scavenger*-Rezeptoren, über die sie modifizierte Lipoproteine aufnehmen können. So werden Cholesterinester im Zytoplasma angehäuft und die Makrophagen entwickeln sich zu Schaumzellen, d.h. zu mit Lipiden gefüllten Makrophagen, und es entstehen sogenannte *fatty streaks* als frühe Anzeichen der Atherosklerose (Libby, 2006) (Abbildung 1).

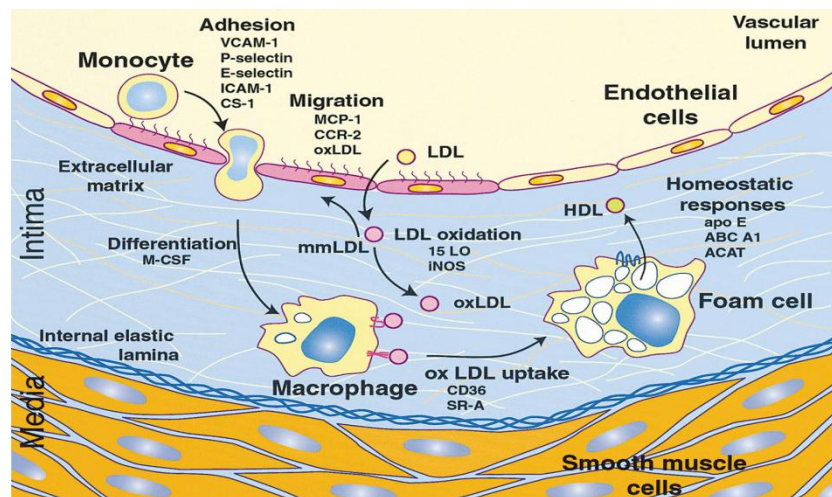


Abbildung 1: Initiierende Ereignisse in der Atherosklerose.

Durch die Einwanderung von Monozyten in die Intima, Differenzierung zu Makrophagen und Aufnahme von oxLDL bilden sich Schaumzellen, die sich in der Intima der Gefäßwand ablagern (Glass und Witztum, 2001).

Auch wenn die Rekrutierung von Monozyten in die Gefäßwand und ihre anschließende Differenzierung zu Makrophagen anfänglich eine protektive Funktion hat, indem zytotoxische und pro-inflammatorische oxLDL Partikel oder absterbende Zellen entfernt werden, führt eine fortschreitende Anhäufung von Makrophagen schließlich zur Bildung von atherosklerotischen Läsionen (Glass und Witztum, 2001). Des Weiteren sezernieren Makrophagen Zytokine, die zur Anlockung von T-Zellen führen. Glatte Muskelzellen transmigrieren ebenfalls in die Intima, wo sie proliferieren und extrazelluläre Matrixproteine produzieren, was zu immer größeren Ablagerungen in der Gefäßwand und mit der Zeit zur Entstehung von fibrösen Plaques führt (Abbildung 2).

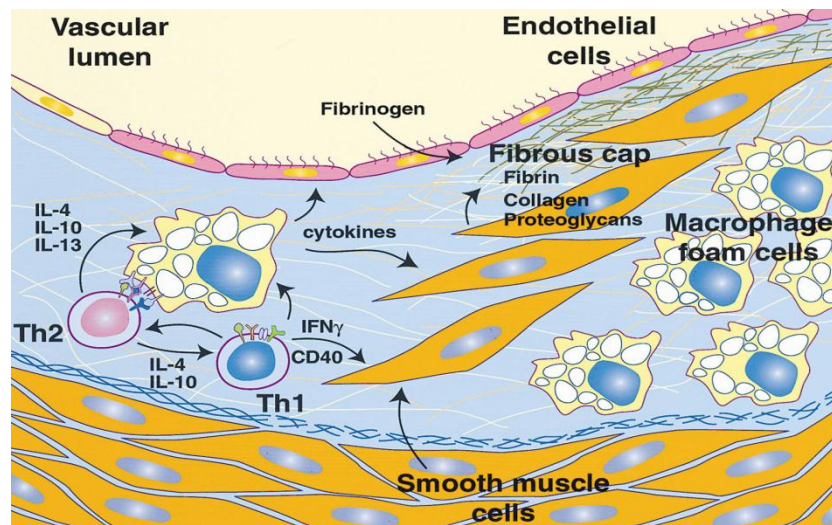


Abbildung 2: Fortschreiten der atherosklerotischen Prozesse in der Gefäßwand.

Zytokine, die von T-Zellen und Makrophagen sezerniert werden, führen zur Transmigration von glatten Muskelzellen, die durch ihre Proliferation und die Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen zur Entstehung von Plaques beitragen (Glass und Witztum, 2001).

Die Ursache für die Entstehung von akuten kardiovaskulären Ereignissen liegt in der Plaque-Ruptur, die sich meist an Stellen mit hoher Dichte an inflammatorischen Zellen ereignet. Makrophagen sezernieren verschiedene proteolytische Enzyme, die den Abbau der fibrösen Kappe begünstigen, T-Zellen tragen durch Sekretion von Interferon γ (IFN γ) zu einer verminderten Produktion von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen bei, was insgesamt in einer immer dünner werdenden fibrösen Kappe resultiert (Lusis, 2000). Wenn diese schließlich aufbricht (Abbildung 3), werden Blutbestandteile mit Thromboplastin (*tissue factor*), das von Endothelzellen und Makrophagen produziert wird, in Kontakt gebracht, wodurch die Gerinnungskaskade mit der Aggregation von Blutplättchen und der Bildung eines Thrombus aktiviert wird. Da der Thrombus in das Gefäßlumen ragt, welches durch die sich ausbreitenden Ablagerungen in der Intima bereits verengt ist, kann je nach Ausmaß ein Gefäßverschluss entstehen und so ein Herzinfarkt oder Schlaganfall verursacht werden.

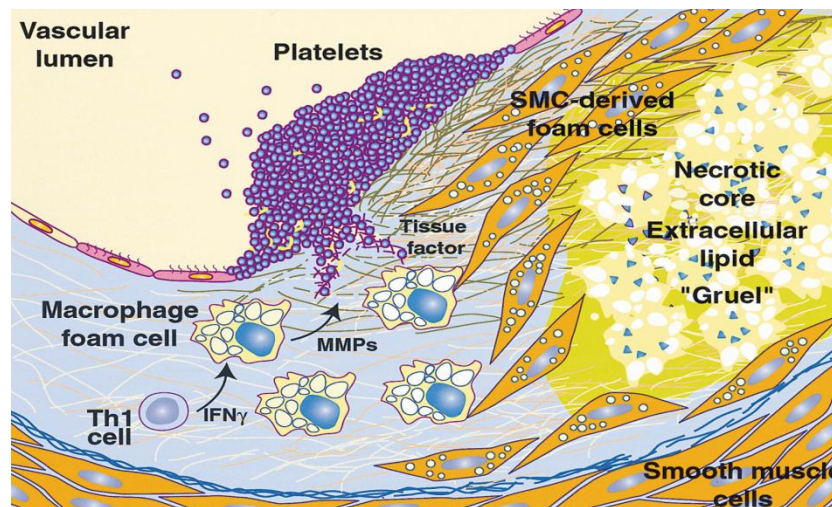


Abbildung 3: Ruptur eines Plaques und Thrombusbildung.

Durch das Aufbrechen der fibrösen Kappe wird über die Blutgerinnungskaskade ein Thrombus gebildet, der zum Gefäßverschluss führen kann (Glass und Witztum, 2001).

Es gibt verschiedene Faktoren, welche die Anfälligkeit für die Ausbildung von Atherosklerose und damit das Risiko für KHK/HI beeinflussen. Man kann dabei zwischen beeinflussbaren (z.B. Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hypertonie, Rauchen) und nicht-beeinflussbaren (Alter und Geschlecht) Risikofaktoren unterscheiden. Die INTERHEART Studie, bei der 15.000 gesunde Kontrollen mit 15.000 HI-Patienten weltweit aus verschiedenen Regionen und Ethnizitäten verglichen wurden, ermittelte Rauchen und abnorme Lipidwerte als stärkste Risikofaktoren, denen Diabetes mellitus, Hypertonie, psychosoziale Faktoren sowie abdominale Adipositas folgen (Ounpuu *et al.*, 2001; Yusuf *et al.*, 2004). Weiter wurde berichtet, dass 90 % der HI-Fälle aufgrund von insgesamt neun beeinflussbaren Risikofaktoren erklärt werden können. Nichtsdestotrotz wurde bereits in früheren Fall-Kontroll-Studien eine 2- bis 4-fach höhere Prävalenz (= relative Häufigkeit von Krankheitsfällen während einer bestimmten Zeitdauer) für positive Familienanamnese bei Personen mit stabiler KHK im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen geschätzt (Friedlander *et al.*, 1998; Leander *et al.*, 2001). Auch spätere Studien, die nicht mehr auf Selbstberichten der Probanden, sondern auf validierten kardiovaskulären Ereignissen beruhten, haben gezeigt, dass das Auftreten familiärer KHK ein stabiler Prädiktor für KHK ist, auch nach Adjustierung für alle bekannten Risikofaktoren (Lloyd-Jones *et al.*, 2004; Murabito *et al.*, 2005). Das lässt darauf schließen, dass dieser komplexen Erkrankung eine starke genetische Komponente zugrunde liegt, was auch durch Zwillingsstudien bestärkt wurde. Beispielsweise machte eine Studie mit 21.000 schwedischen Zwillingen deutlich, dass männliche, eineiige Zwillinge ein 8,1-fach erhöhtes Risiko und zweieiige Zwillinge ein 3,8-

fach erhöhtes Risiko für KHK oder HI hatten, wenn der andere Zwilling bereits vor dem 55. Lebensjahr durch kardiovaskuläre Ursache verstorben war (Marenberg *et al.*, 1994; Zdravkovic *et al.*, 2002).

Um genauere Einblicke in die Genetik von KHK und HI zu bekommen, wurden in den vergangenen Jahren genomweite Assoziationsstudien (*genome-wide association study*, GWAS) mit sehr großen Kollektiven durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) mit dem Auftreten von KHK oder Herzinfarkt assoziiert sind und häufiger in Kranken als in gesunden Kontrollpersonen auftreten. Genomweite Signifikanz wird dabei ab einem p-Wert $<5 \cdot 10^{-8}$ angesehen. Der bisher wohl stabilste Befund liegt auf Chromosom 9p21.3 (Abbildung 4) und wurde im Jahr 2007 fast zeitgleich von mehreren Gruppen veröffentlicht (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007; Helgadottir *et al.*, 2007; McPherson *et al.*, 2007; Samani *et al.*, 2007).

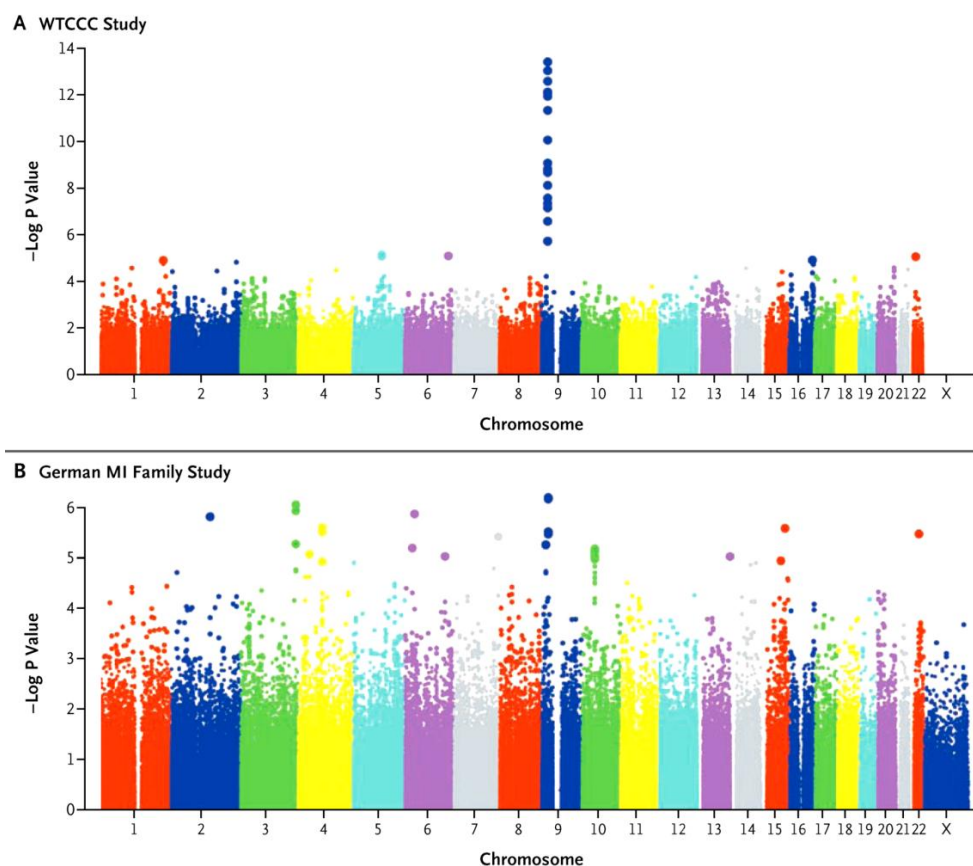


Abbildung 4: Manhattan-Plot der Ergebnisse der GWAS.

Jeder Punkt im Diagramm entspricht einem getesteten SNP, aufgetragen nach seiner chromosomalen Lage (x-Achse) und dem zugehörigen $-\log_{10}$ p-Wert für Assoziation (y-Achse). Schon bei der Deutschen Herzinfarkt-Familienstudie (B) war das Signal auf Chromosom 9 zu sehen, sehr deutlich wurde es mit steigender Power der größeren Studie des WTCCC (A) (Samani *et al.*, 2007).

Es folgten zahlreiche Studien, die den Befund bestätigten und diesen Risiko-Locus zum meist replizierten genetischen Marker für KHK und HI machen (Broadbent *et al.*, 2008; Schunkert *et al.*, 2008; Samani *et al.*, 2009; Palomaki *et al.*, 2010). Die etwa 58 kb umfassende Region auf Chromosom 9p21.3 enthält mehrere SNPs, die eine Assoziation mit KHK und HI gezeigt haben und von denen viele in starkem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) liegen, was bedeutet, dass sie mit sehr großer Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt werden. Der *lead*-SNP rs1333049 bildet zusammen mit den SNPs rs7044859, rs1292136 (= rs496892) und rs7865618 den Risiko-Haplotyp ACAC, der eine stärkere Assoziation zeigte als die einzelnen SNPs (Schunkert *et al.*, 2008). Als Haplotyp bezeichnet man die Kombination von bestimmten Allelen (= Ausprägungen der SNPs), die aufgrund ihrer chromosomalen Nähe und bei Vorliegen von starkem LD gemeinsam vererbt werden. Das mit einer Frequenz von 50 % häufig vorkommende Risiko-Allel vermittelt eine Erhöhung des KHK-Risikos von etwa 30 % bzw. 60 % für Träger von einem bzw. zwei Risiko-Allelen. Dagegen ist der nicht-risiko Haplotyp TTGG mit leicht gesenktem Risiko für KHK assoziiert. Interessanterweise ist der Assoziationsbefund auf Chromosom 9p21.3 unabhängig von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Hyperlipidämie und Rauchen (Helgadottir *et al.*, 2007; McPherson *et al.*, 2007; Samani *et al.*, 2007). Dies lässt vermuten, dass der Locus das Risiko für Atherosklerose und KHK/HI durch einen bisher unbekannten Mechanismus beeinflusst.

1.2 Gene in der Umgebung des KHK Risiko-Locus auf Chromosom 9p21.3

Im 58 kb-Bereich der mit KHK und HI assoziierten SNPs auf Chromosom 9p21.3 liegen keine Protein-kodierenden Gene. In der Umgebung befinden sich die zwei Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren *CDKN2A* und *CDKN2B* und die Methylthioadenosin-Phosphorylase *MTAP* (Abbildung 5). Außerdem liegt eine lange nicht-kodierende RNA in der Region, für die es inzwischen mehrere Synonyme gibt: *ANRIL* (*antisense noncoding RNA in the INK4 locus*), *CDKN2BAS* (*CDKN2B antisense RNA*) oder *CDKN2B-AS1* (*CDKN2B antisense RNA 1*). Im Folgenden wird die Bezeichnung *CDKN2BAS* verwendet.

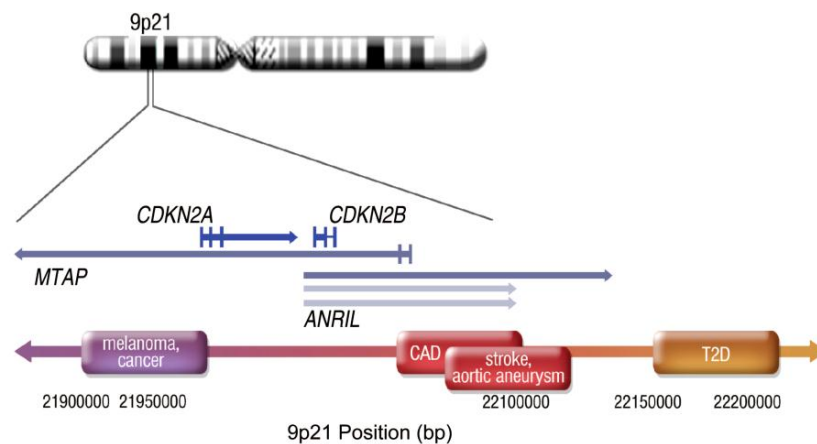


Abbildung 5: Überblick über den Chromosom 9p21.3 Locus.

Schematische Darstellung der chromosomalen Lage des 9p21.3 Locus mit den Genen *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2BAS* (=ANRIL) und *MTAP*. Die kodierten Transkripte sind als graue Pfeile entsprechend ihrer Lage und Richtung dargestellt. Im unteren Bereich sind verschiedene Phänotypen dargestellt, mit denen verschiedene Abschnitte des 9p21.3 Locus eine Assoziation zeigen. T2D, *type 2 diabetes* (Zeller *et al.*, 2012).

Genau genommen kodiert der sogenannte *INK4b-ARF-INK4a* Locus (*inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*, INK), in dem die Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* liegen, für drei Proteine: *CDKN2B* kodiert für $p15^{\text{INK4b}}$, *CDKN2A* kodiert für $p16^{\text{INK4a}}$ und außerdem für $p14^{\text{ARF}}$ (*alternative reading frame*). Dieses Protein hat seinen Namen aufgrund des alternativen Leserahmens bekommen. Es besteht aus einem alternativen Exon 1 β sowie Exon 2 und 3 von *CDKN2A*, wobei Exon 2 in einem anderen Leserahmen translatiert wird, als für $p16^{\text{INK4a}}$ verwendet wird (Quelle *et al.*, 1995). Alle drei Proteine haben die Fähigkeit als Tumorsuppressoren zu agieren und sind in die Zellzykluskontrolle bei Prozessen wie Proliferation, Apoptose und Zellalterung involviert (Gil und Peters, 2006). Zellwachstum wird auf zwei Hauptwegen kontrolliert: Der eine beinhaltet das Retinoblastom-Protein (pRB) und reguliert den Austritt aus der G1-Phase des Zellzyklus (Weinberg, 1995), der andere läuft über das Protein p53, das einen Wachstumsstillstand oder Apoptose in Folge von zellulärem Stress induziert (Levine, 1997).

Wichtig für den Austritt aus der G1-Phase in die S-Phase ist die Transkription von Genen, die unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors E2F sind, der im Ruhezustand von pRB gebunden vorliegt und so an der Aktivierung der Transkription gehindert wird. Der Übergang zur Initiierung der DNA-Synthese erfolgt durch Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, CDK) CDK4 und CDK6, die mit D-Cyclinen Komplexe bilden und pRB phosphorylieren, wodurch dieses E2F freigibt und die Transkription der Gene erfolgen kann (Gil und Peters, 2006). Die beiden Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI) $p16^{\text{INK4a}}$

und p15^{INK4b} konkurrieren mit den D-Cyclinen und binden die CDKs in inaktiven Komplexen, wodurch keine Phosphorylierung von pRB stattfinden kann und es zu einem Zellzyklus-Arrest kommt. Der zweite Signalweg läuft über den Tumorsuppressor und Transkriptionsaktivator p53, der normalerweise von der Ubiquitin-Ligase MDM2 in seiner Aktivität gehemmt und zum Proteasom-vermittelten Abbau geführt wird (Ivanchuk *et al.*, 2001). p14^{ARF} kann an MDM2 binden und dessen Ubiquitin-Ligase Aktivität hemmen. Durch erhöhte Expression von p14^{ARF}, beispielsweise in Folge von onkogenen Signalen oder zellulärem Stress, kommt es zu einer Stabilisierung von p53 und zu einer gesteigerten Expression der *downstream* Proteine wie p21^{CIP1}. Dabei handelt es sich um einen CKI, der entweder in der G1- oder G2-Phase einen Zellzyklus-Arrest auslösen kann.

Die strenge Kontrolle des Zellzyklus ist absolut essentiell und führt bei unkontrollierten Abweichungen häufig zur Entstehung von Tumoren und Krebs. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod spielt auch eine Rolle bei der Atherosklerose, wo vaskuläre glatte Muskelzellen exzessive Proliferation aufweisen, was zur Bildung der fibrösen Gewebsstruktur in der Gefäßwand führt (Rivard und Andres, 2000). Im atherosklerotischen Mausmodell mit Deletion des Apolipoprotein E (ApoE), das durch die Entwicklung einer Hyperlipidämie und fortschreitender atherosklerotischer Läsionen gekennzeichnet ist, konnte eine protektive Rolle für p19^{ARF} (entspricht dem humanen p14^{ARF}) gezeigt werden. Diese wurde durch den pro-apoptotischen Effekt von p19^{ARF} auf Makrophagen und glatte Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen vermittelt (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2010). Die zusätzliche Deletion von p19^{ARF} führte zu einer verminderten Apoptose sowohl in atherosklerotischen Läsionen als auch in kultivierten Makrophagen und glatten Muskelzellen.

Einen weiteren Link zur Zellproliferation bildet das ebenfalls in der 9p21.3-Region gelegene Gen *MTAP*. Das kodierte Enzym katalysiert die Phosphat-abhängige Abspaltung eines Adenins von 5'-Desoxy-5'-methylthioadenosin, einen Schritt in der Polyamin-Biosynthese (Savarese *et al.*, 1981). Polyamine gehören zu einer Molekülkategorie, deren Synthese während der G1-Phase des Zellzyklus stark aktiviert wird und die in die Vorbereitung der Zelle für die DNA-Replikation eingebunden ist (Heby, 1981). Direktes Binden von Polyaminen an DNA und ihre Fähigkeit, DNA-Protein Interaktionen zu modulieren, scheinen wichtig zu sein für die molekularen Mechanismen, mit denen Polyamine an der Zellproliferation beteiligt sind (Thomas und Thomas, 2001).

Für *CDKN2BAS*, das als viertes Gen im 9p21.3 KHK Risiko-Locus teilweise mit assoziierten SNPs überlappt und nicht für ein Protein kodiert, ist bisher keine genaue Funktion

beschrieben, allerdings wurde für die lange nicht-kodierende RNA eine eher regulatorische Rolle postuliert (Congrains *et al.*, 2012). Da die benachbarten Gene *MTAP*, *CDKN2A* und *CDKN2B* in die bei der Atherosklerose wichtigen Prozesse der Zellproliferation und Apoptose involviert sind, war es naheliegend, dass ein möglicher *cis*-Effekt von *CDKN2BAS* auf diese Gene in Betracht gezogen wurde. Darunter versteht man eine räumliche Nähe zwischen einer genetischen Variante und einem Locus (Gen), der durch diese Variation beeinflusst wird, im Gegensatz zu *trans*-Effekten mit einem Wirkungsort an entfernter Stelle im Genom. Die veröffentlichten Untersuchungen darüber, ob *CDKN2BAS* abhängig von bestimmten Risiko-Allelen im 9p21.3 Locus unterschiedliche Effekte auf die Nachbargene zeigt, ergaben aber keinen einheitlichen Befund (zusammengefasst in (Holdt und Teupser, 2012)). Zum ersten Mal beschrieben wurde *CDKN2BAS* unter dem Synonym *ANRIL* aufgrund seiner Transkriptionsrichtung *antisense* zu *CDKN2B* kurz vor den Assoziationsbefunden von Chromosom 9p21.3 in der Untersuchung einer französischen Familie mit Keimbahn-Deletion der gesamten *INK4-ARF* Region (Pasmant *et al.*, 2007). Im Laufe der folgenden Jahre kamen viele Studien hinzu, die neben der Assoziation des Locus mit KHK die Expression der kodierten Transkripte abhängig von 9p21.3 Risiko-Allelen in verschiedenen Zellsystemen wie T-Zellen, vaskulärem Gewebe oder Blut untersucht haben (Burd *et al.*, 2010; Cunnington *et al.*, 2010; Holdt *et al.*, 2010; Holdt *et al.*, 2011; Jarinova *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Es wurden mehrere Spleißvarianten identifiziert (Folkersen *et al.*, 2009), einschließlich kreisförmiger und trans-gespleißter RNA-Formen (Burd *et al.*, 2010). Diese Untersuchungen haben auch gezeigt, dass *CDKN2BAS* kein einheitliches Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen aufweist. Des Weiteren wurde eine Rolle der nicht-kodierenden RNA in der komplexen epigenetischen Genexpressionsregulation im Zusammenhang mit Mitgliedern der Polycomb-Proteinfamilie postuliert (Kotake *et al.*, 2011). Weiter verkompliziert wird das Verständnis der zu Grunde liegenden Pathophysiologie durch die Assoziation der Region auf Chromosom 9p21.3 mit weiteren Phänotypen (siehe Abbildung 5), wie zum Beispiel Typ 2 Diabetes (Zeggini *et al.*, 2007), ischämischem Schlaganfall (Gschwendtner *et al.*, 2009), Aortenaneurysma (Helgadottir *et al.*, 2008), Hautkrebs (Bishop *et al.*, 2009) und Periodontitis (Schaefer *et al.*, 2009).

1.3 Verwendetes Modell: Makrophagen, atherogene Stimulierungen und genomweite Genexpression

Um die Pathomechanismen des Risiko-Locus 9p21.3 zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Ansatz einer allel-spezifischen Expressionsstudie in humanen Makrophagen gewählt. Diese Zellen spielen, wie bereits beschrieben, eine sehr wichtige Rolle in der Atherosklerose, denn sie sind sowohl am veränderten Lipidstoffwechsel als auch der Inflamationsreaktion beteiligt.

Eine erhöhte Plasmakonzentration an Cholesterin wird insbesondere durch LDL-Cholesterin bedingt. Mit Hilfe von LDL-Partikeln wird Cholesterin zu peripheren Geweben transportiert und dort über den LDL-Rezeptor auf den Zellen erkannt und aufgenommen. In den Arterien kann es durch Oxidation zur Modifikation der LDL-Partikel kommen, so dass das gebildete oxLDL nicht mehr vom LDL-Rezeptor erkannt werden kann. Makrophagen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche sogenannte *scavenger*-Rezeptoren, über die sie modifiziertes LDL aufnehmen können (Glass und Witztum, 2001). Dadurch kommt es zur Anhäufung von Cholesterin in den Zellen. Die Makrophagen haben zwei Mechanismen, wie sie mit dem Überschuss an Cholesterin umgehen: enzymatische Modifikation zu löslicheren Formen und Transport aus der Zelle mit Hilfe von Membrantransportern. Hohe Expression des Enzyms Cholesterin-27-Hydroxylase in Makrophagen sorgt für die Ausscheidung durch Umwandlung von Cholesterin in die löslichere Form des 27-OH-Cholesterin (Bjorkhem, 1992). Der Hauptweg läuft aber über Membrantransporter wie ABCA1, wobei hauptsächlich *high-density* Lipoprotein (HDL) als extrazellulärer Akzeptor dient. Mutationen in dem *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter gelten als Ursache für die Tangier-Krankheit, die durch extrem niedrige HDL-Plasmaspiegel und starke Cholesterin-Anhäufung in den Zellen gekennzeichnet ist (Lawn *et al.*, 1999). Modifizierte LDL-Partikel werden sehr schnell von Makrophagen aufgenommen und es kommt zur Bildung von Schaumzellen, von denen die meisten innerhalb der Läsion durch Apoptose bzw. Nekrose absterben.

Eine Verstärkung der atherosklerotischen Prozesse wird durch pro-inflammatorische Zytokine vermittelt, die von Endothelzellen, Makrophagen, T-Zellen sowie glatten Muskelzellen sezerniert werden. Endothelzellen exprimieren beispielsweise MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, auch CCL2 genannt), wodurch Leukozyten wie Monozyten, T- und B-Zellen angelockt werden, die den Chemokin-Rezeptor CCR2 exprimieren (Hansson *et al.*, 2006). Makrophagen sezernieren, aktiviert unter anderem von infiltrierenden Lipoproteinen, Interleukine wie IL1 und IL6, den Tumornekrose-Faktor TNF α und den Wachstumsfaktor TGF β . T-Zellen produzieren beispielsweise Interferon γ (IFN γ),

das wiederum einen stimulierenden Effekt auf Makrophagen hat. Durch Ausschüttung verschiedener Zytokine wird der Entzündungsprozess vorangetrieben und aufrechterhalten. Auch *Toll-like* Rezeptoren (TLR), die unter normalen Bedingungen in der angeborenen Immunantwort stark konservierte Motive von Pathogenen erkennen, sind an der Regulation der Atherosklerose beteiligt. Durch ihre Aktivierung wird ebenfalls die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen induziert (Hansson, 2009). Der fortschreitende Entzündungsprozess kann in Patienten anhand von bestimmten Markern im Blut festgestellt werden. Beispielsweise weist das C-reaktive Protein (CRP) eine erhöhte Konzentration auf, oft schon weit bevor klinische Symptome der Atherosklerose auftreten (Mazer und Rabbani, 2004). CRP wird von der Leber als Antwort auf verschiedenste Entzündungsprozesse ins Blut abgegeben, wofür insbesondere ein erhöhter IL6-Spiegel als Auslöser gilt (Mullenix *et al.*, 2005). Früher galt CRP als nicht-spezifischer Entzündungsmarker, der an Immunzell-Chemotaxis, Phagozytose, Aktivierung des Komplementsystems und von Blutplättchen sowie der Beseitigung von Immunkomplexen, nekrotischen Zellen und bakteriellen Bestandteilen beteiligt ist. Allerdings wird CRP auch lokal in atherosklerotischen Plaques von Makrophagen und glatten Muskelzellen produziert und ist an wichtigen Schritten der Entstehung von Plaques beteiligt (Mazer und Rabbani, 2004).

Um diese Situation *in vitro* nachzuahmen, sollten in dieser Arbeit humane Makrophagen mit atherogenen, d.h. eine Atherosklerose hervorrufenden Substanzen stimuliert werden. Dabei wurde zum einen die Kombination aus 9-*cis* Retinsäure (9-*cis retinoic acid*, 9cRA) und T0901317 gewählt, was einer Überversorgung der Zellen mit Lipiden entspricht und Mechanismen aktivieren sollte, die auf den veränderten Lipidstoffwechsel ansprechen. 9cRA, ein Derivat von Vitamin A (Retinoid), ist ein natürlicher Agonist für den Retinoid-X-Rezeptor (RXR) (Allenby *et al.*, 1993). Dieser Kernrezeptor bildet Heterodimere unter anderem mit den Leber-X-Rezeptoren LXR α oder LXR β , Farnesoid-X-Rezeptoren und Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren, wodurch nach Ligandenbindung die Expression von Zielgenen induziert wird. Dadurch werden verschiedene Rezeptorsignalwege beeinflusst, die von der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Monczak *et al.*, 1997) bis hin zur Regulation von Glucose- und Lipid-Stoffwechsel (Mukherjee *et al.*, 1997) reichen. Zumindest einige dieser Prozesse sind bei der Entstehung von Atherosklerose in ihrem Gleichgewicht gestört. In Folge von Aktivierung mit Retinsäure konnte in humanen THP-1 Zellen eine Hochregulation von CD36 beobachtet werden, das für die Aufnahme von modifiziertem LDL und Fettsäuren in die Zellen verantwortlich ist (Wuttge *et al.*, 2001). Außerdem wird die Expression von CD14 und CD16 hochreguliert, wobei besonders CD14

auf Monozyten eine pro-inflammatorische Wirkung in der Antwort auf Lipopolysaccharid (LPS) hat (Langmann *et al.*, 2005). Als weiteren Eingriff in die zellulären Prozesse konnte in ApoE-*Knockout*-Mäusen durch Aktivierung von RXR eine Reduktion der Atherosklerose-Entwicklung beobachtet werden (Caudel *et al.*, 2001). Dies scheint, induziert von RXR-LXR Heterodimeren, an die Aktivierung des reversen Cholesterintransports über ABC1-Transporter gekoppelt zu sein. Bei T0901317 handelt es sich um einen der meist verwendeten synthetischen LXR-Agonisten. Natürliche Liganden für diese Rezeptoren sind Oxysterole, also oxidierte Cholesterin-Derivate (Zanotti *et al.*, 2008). Durch Ligandenbindung bilden sich LXR-RXR Heterodimere, die an LXR *response* Elemente in Promotorsequenzen von verschiedenen Zielgenen binden und deren Expression aktivieren (Wojcicka *et al.*, 2007). Auch für diesen synthetischen Liganden wurde eine Rolle im Lipid-Stoffwechsel beobachtet, was sich in verminderter Atherosklerose-Entwicklung in Mäusen ohne LDL-Rezeptor (Terasaka *et al.*, 2003) sowie einer erhöhten HDL-Plasmakonzentration äußert (Schultz *et al.*, 2000). Allerdings wird durch T0901317 auch eine Hypertriglyzeridämie verursacht (Schultz *et al.*, 2000), die einen Risikofaktor für KHK darstellt. Bei den LXR-RXR Dimeren handelt es sich um „tolerante“ Komplexe, die sowohl von LXR- als auch von RXR-Agonisten aktiviert werden können. Durch den Einsatz beider Arten von Liganden gleichzeitig wird eine stärkere Antwort erzielt als wenn nur ein Agonist alleine verwendet wird (Wojcicka *et al.*, 2007).

Zum anderen sollten humane Makrophagen mit einer pro-inflammatorischen Mischung aus IFN γ und LPS stimuliert werden. Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und bestehen aus drei Bereichen, dem Lipid A, dem Kernpolysaccharid, das sich in innere und äußere Kernregion unterteilen lässt, und dem O-Polysaccharid (Erridge *et al.*, 2002). Das hydrophobe Lipid A bildet die infektiöse Komponente und führt zur Aktivierung des Immunsystems. Dabei wird LPS bzw. das Lipid A zuerst vom Plasmaprotein LPS-Bindeprotein (LBP) gebunden (Schumann *et al.*, 1990), wodurch LPS-Monomere aus Aggregaten oder der Bakterienzellwand extrahiert werden und so die Erkennung durch den CD14-Rezeptor erleichtert wird. CD14, ein Oberflächenrezeptor von Monozyten/Makrophagen, ist ein GPI-Ankerprotein ohne intrazelluläre Domäne für Signaltransduktion, kann aber auch in löslicher Form vorkommen. Der Rezeptor bindet den LPS-LBP Komplex (Wright *et al.*, 1990) und übergibt ihn an einen Komplex aus TLR4 und dessen assoziierten Co-Rezeptor MD2, wodurch es zu einer Liganden-induzierten Homodimerisierung und Signalweiterleitung kommt (Ostuni *et al.*, 2010). TLRs, insbesondere TLR4, induzieren die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL6 und IL1 β , deren Transkription durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 reguliert wird.

Bei IFN γ handelt es sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin, das insbesondere von aktivierten T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen wie Makropagen, dendritischen Zellen und B-Zellen produziert wird. Aktivierung von Makrophagen gehört zu den Haupteffekten von IFN γ und resultiert in einer Erhöhung von pro-inflammatorischen Parametern wie IL12, IL15, TNF α , der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) und Caspase 1 (Muhl und Pfeilschifter, 2003). Die insgesamt sehr große Bandbreite an zellulären Effekten von IFN γ wird in den aktivierten Zellen durch Aktivierung eines Signalwegs bewirkt. Dabei spielt vor allem der Januskinase (JAK)/ *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) Signalweg eine Rolle, der damit beginnt, dass IFN γ an zwei IFN γ -Rezeptor (IFN γ R) Untereinheiten bindet und diese dadurch zur Dimerisierung veranlasst (van Boxel-Dezaire und Stark, 2007). Daraufhin binden die beiden Januskinasen JAK1 und JAK2 an den aktivierten Rezeptorkomplex und phosphorylieren sich gegenseitig. Ebenso werden die beiden IFN γ R Untereinheiten an Tyrosinen ihrer zytoplasmatischen Enden phosphoryliert, was ein Signal für die Anlagerung von STAT1-Monomeren darstellt. Diese können über ihre *src-homology 2* (SH2)-Domäne an die Phosphotyrosine des Rezeptors binden, werden durch die JAKs an Tyrosin 701 phosphoryliert, dissoziieren und bilden über Phosphotyrosine und die SH2-Domänen STAT1-Dimere, die in den Zellkern wandern. Dort binden sie an γ -aktivierte Sequenz (GAS)-Elemente in den Promotoren von Genen, die auf IFN γ ansprechen, und aktivieren so deren Transkription (McLaren und Ramji, 2009). Da IFN γ von vielen Zelltypen in den atherosklerotischen Läsionen produziert wird, kommt es zu einem schnellen Voranschreiten der Entzündungsreaktion in der Gefäßwand. Mit diesem Signalweg ist die KHK-Assoziationsregion auf Chromosom 9p21.3 bereits beschrieben. In einem *Enhancer* wurde eine STAT1-Bindestelle identifiziert, die durch zwei mit KHK assoziierte SNPs zerstört wird (Harismendy *et al.*, 2011). Durch den siRNA-vermittelten *Knockdown* von STAT1 konnte ein Effekt auf die Expression von *CDKN2BAS* und *CDKN2B* gezeigt werden, was eine wichtige Rolle der Interaktion von STAT1 mit dem *Enhancer* und damit des IFN γ -Signalwegs in der Regulation des INK4/ARF Locus und der Suszeptibilität für KHK vermuten lässt. Der Einsatz von IFN γ in Kombination von LPS bewirkt eine stärkere Aktivierung der Makrophagen, als mit nur einer der Substanzen zu erreichen wäre. Von IFN γ ist bekannt, dass es zu einer Primärantwort führt, durch LPS werden die Zellen dann vollständig aktiviert (Hamilton und Adams, 1987).

Es existiert eine große Vielfalt an Microarrays zur Messung von verschiedenen biologischen Daten wie Genexpression, Proteinmenge, Proteinbindung oder genomischen Varianten. Der Vorteil im Vergleich zu anderen Methoden liegt darin, dass sie nicht nur ein einzelnes Gen

oder Protein messen, sondern tausende. Microarray-Daten repräsentieren somit eine Momentaufnahme des gesamten Proteoms oder Transkriptoms innerhalb der untersuchten Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt. In dieser Arbeit wurden Genexpressionsdaten erzeugt und analysiert. Die beiden Haupttypen von Genexpressions-Microarrays sind der cDNA-Microarray, der 1995 im Labor von Patrick Brown entwickelt wurde (Schena *et al.*, 1995) und der hochdichte Oligonukleotid-Array, der 1996 von Affymetrix entwickelt wurde (Lockhart *et al.*, 1996). Die Microarray-Technologien entwickelten sich zu Hochdurchsatz-Methoden sind ein wertvolles Hilfsmittel für die moderne Molekularbiologie. Ihre vielseitig einsetzbaren Anwendungen sind verantwortlich für den großen Erfolg. Sie können verwendet werden, um differenziell exprimierte Gene zwischen Proben verschiedenen biologischen Ursprungs zu detektieren (Chee *et al.*, 1996) oder um Gensets zu identifizieren, die verschiedene Arten von Proben unterscheiden, was hilfreich für Diagnosen und Prognosen ist (van 't Veer *et al.*, 2002). Andere Microarray-Technologien können eingesetzt werden für die Untersuchung von Polymorphismen (Wang *et al.*, 1998), Sequenzierung (Pease *et al.*, 1994), die Detektion von Protein-DNA Interaktionen (Ren *et al.*, 2000) sowie von DNA-Methylierung (Bibikova *et al.*, 2011).

1.4 Zwei Mechanismen der Genregulation in Eukaryoten: alternatives Spleißen und DNA-Methylierung

Genregulation bezeichnet die Steuerung der Aktivität von Genen bzw. genauer gesagt die Steuerung der Genexpression. Dadurch wird festgelegt, in welcher Menge das von dem Gen kodierte Transkript bzw. Protein in der Zelle vorliegen soll. Es gibt dabei verschiedene Schritte, an denen regulatorische Faktoren einwirken können, wie bei der Initiation oder Termination der Transkription sowie post-transkriptional bei der Prozessierung der mRNA, was 5'-*Capping*, 3'-Polyadenylierung und Spleißen umfasst (Licatalosi und Darnell, 2010). Über die Stabilität der mRNA, die Translation sowie post-translationale Modifikationen an den entstandenen Proteinen kann eine weitere Regulation erfolgen. Insbesondere durch alternatives Spleißen von Vorläufer-mRNAs entsteht eine große Vielfalt an mRNAs, die wiederum von anderen regulatorischen Mechanismen genutzt werden kann (Kalsotra und Cooper, 2011). Exons haben an den Intron/Exon-Grenzen definierte Spleißsignale, die eine 5'-Spleißstelle (SS), eine 3'-SS, eine Verzweigungsstelle (*branching point*, BP) und eine Polypyrimidin-reichen Bereich zwischen BP und 3'-SS beinhalten. Diese Konsensus-Sequenzen werden von Komponenten der basalen Spleiß-Maschinerie erkannt und gebunden, wodurch die Assemblierung des sogenannten Spleißosoms veranlasst wird.

Dieser Komplex hat zwei Hauptaufgaben, das Erkennen der Intron/Exon-Grenzen und das Herausschneiden von Introns und Zusammenfügen der Exons. Er besteht aus fünf kleinen Kern-Ribonukleoprotein-Partikeln (*small nuclear ribonucleoprotein particle*, snRNP) und mehr als 100 Proteinen. Jedes snRNP ist aus kleinen Kern-RNAs (*small nuclear RNA*, snRNA) und verschiedenen Proteinen zusammengesetzt (Faustino und Cooper, 2003). Das U1-snRNP bindet die 5'-SS, das U2-snRNP bindet an die Verzweigungsstelle über RNA-RNA Interaktionen zwischen der snRNA und der Vorläufer-mRNA. Nach Anlagerung von U4-snRNP, U5-snRNP und U6-snRNP entsteht das vollständige Spleißosom und über die Ausbildung einer intermediären Lassostruktur werden vom katalytischen Zentrum, bestehend aus der U2-snRNA und der U6-snRNA, zwei Umesterungsreaktionen katalysiert, die den eigentlichen Spleißvorgang darstellen (Berg *et al.*, 2003). Wie in Abbildung 6 gezeigt, gibt es verschiedene Arten des alternativen Spleißens, die sich in vier Hauptgruppen einteilen lassen (Keren *et al.*, 2010). Für etwa 40 % aller alternativen Spleißereignisse verantwortlich ist die erste Gruppe des *Exon Skipping*, bei dem ein Exon zusammen mit seinen benachbarten Introns durch Spleißen entfernt wird (Abbildung 6a). Die zweite und dritte Gruppe werden durch die Verwendung alternativer 3'-SS und 5'-SS gebildet (Abbildung 6b und 6c), was der Fall ist, wenn zwei oder mehrere Spleißstellen am Ende eines Exons erkannt werden. Als vierte Untergruppe gibt es die *Intron Retention*, bei der ein Intron in der reifen mRNA erhalten bleibt (Abbildung 6d). Außerdem existieren noch weniger häufig vorkommende Spleißereignisse, wie sich gegenseitig ausschließende Exons (Abbildung 6e), die Nutzung alternativer Promotoren (Abbildung 6f) und alternative Polyadenylierung (Abbildung 6g).

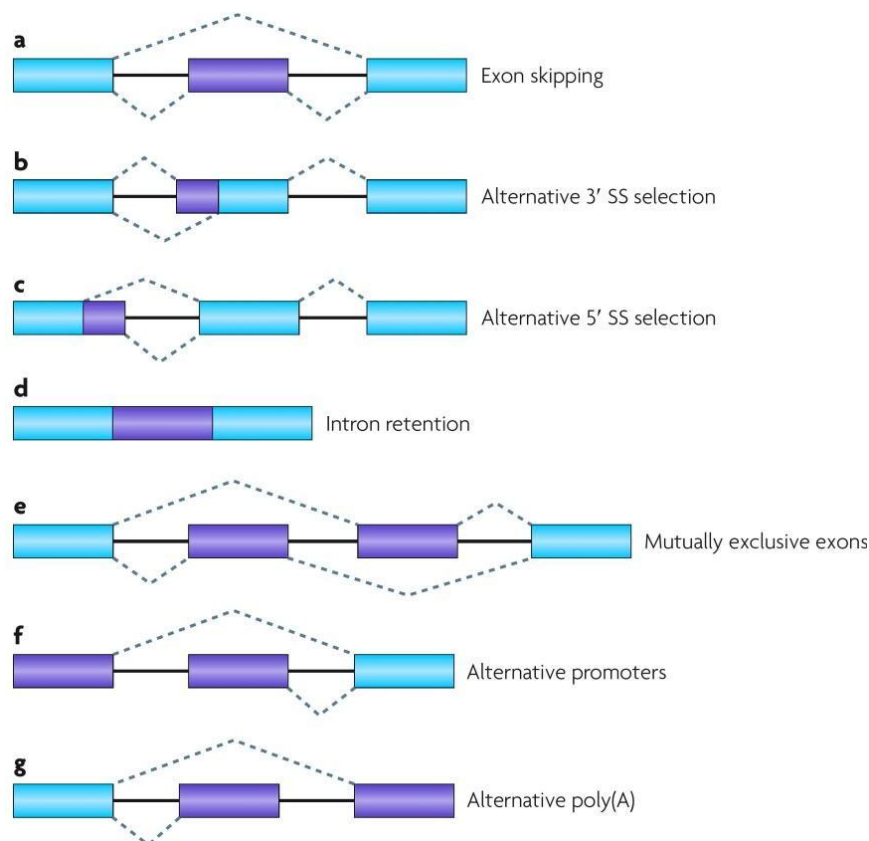


Abbildung 6: Verschiedene Arten des alternativen Spleißens.

Konstitutiv exprimierte Exons (türkis) können auf verschiedene Arten mit alternativ gespleißten Bereichen (violett) kombiniert werden. Introns sind durch schwarze Linien dargestellt, gestrichelte Linien zeigen die Spleiß-Optionen an (Keren *et al.*, 2010).

Die Zahlen über die Häufigkeit von alternativem Spleißen variieren zwischen früheren Schätzungen, die besagen, dass 35-40 % aller Gene mindestens eine alternative Isoform haben, und aktuellen Schätzungen basierend auf Hochdurchsatz-Sequenzierungen und Microarray Experimenten, in denen Zahlen bis zu 95 % angegeben werden (Melamud und Moul, 2009). Diese schwankenden Zahlen beinhalten auch, dass durch nicht-konservierte alternative Spleißereignisse Transkripte in relativ geringen Mengen produziert werden, die keinerlei biologische Funktion haben. Es ist aber offensichtlich, dass alternatives Spleißen entscheidende biologische Effekte hat, wie schon sehr früh am Beispiel funktionell verschiedener Peptidhormone gezeigt wurde (Amara *et al.*, 1982). Für *CDKN2BAS* wurden alternativ gespleißte Transkripte mit unterschiedlichen Effekten auf die Expression der benachbarten Gene beschrieben (Jarinova *et al.*, 2009).

Auch auf Ebene der genomischen DNA können Mechanismen zur Genregulation erfolgen. Es handelt sich dabei um die sogenannte Epigenetik, die gekennzeichnet ist durch Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung, wodurch die Chromatin-Struktur beeinflusst wird und so die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA ermöglicht oder verhindert werden kann (Yan *et al.*, 2010). Regulation durch DNA-Methylierung kommt insbesondere im Bereich regulatorischer Elemente wie Promotoren, *Enhancern* oder *Silencern* vor und dort vor allem an CpG-Dinukleotiden, was für Cytosin-phosphatidyl-Guanin steht und die direkte Nachbarschaft von einem Cytosin und einem Guanin beschreibt. DNA-Methylierung erfolgt mit Hilfe des Methylgruppen-Donors S-Adenosylmethionin an Position 5 des Cytosins und wird katalysiert von DNA-Methyltransferasen (DNMT), wobei DNMT1 für die Erhaltung von Methylierung bei der Zellteilung, DNMT3a und DNMT3b für *de novo* Methylierung verantwortlich sind (Kriukiene *et al.*, 2012). Treten überdurchschnittlich viele CpGs in einem DNA-Abschnitt auf, so spricht man von CpG-Inseln. Diese kommen in den Promotoren von etwa 50 % der Gene vor und zwar oft in solchen, denen *core* Promotor-Elemente wie beispielsweise die TATA-Box fehlen (Carninci *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass alleine der GC-Reichtum ausreicht, um Promotor-Aktivität und Transkriptionsfaktor-Rekrutierung zu vermitteln (Deaton und Bird, 2011). Insbesondere in CpG-Inseln im Bereich von Promotoren findet man keine oder kaum Methylierung, was mit aktiver Transkription assoziiert ist. Dagegen sind in differenzierten Zellen die über das Genom verteilten einzelnen CpGs normalerweise stark methyliert (Illingworth und Bird, 2009).

Nicht nur einzelne Nukleotide können modifiziert werden, sondern auch Histone, die Bestandteile des Chromatins zur Verpackung der DNA. Neben Phosphorylierung und Ubiquitinylierung treten vor allem Methylierung (me) an Lysinen (K) oder Argininen (R) und Acetylierung an Lysinen auf. Histon-Acetylierungen sind mit aktiver Transkription verbunden, was unter anderem durch das Neutralisieren der positiven Ladung des Lysins durch die Acetylgruppe zustande kommt (Schleithoff *et al.*, 2012). Dadurch werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Lysin und der negativen Ladungen an der DNA verringert und es kommt zu einer Öffnung der Chromatin-Struktur. Methylierungen der Histone können die Transkription positiv oder negativ beeinflussen und teilweise werden bis zu drei Methylgruppen (me1 bis me3) auf eine Aminosäure übertragen. Histon-Methylierungen sind häufig am Histon H3 zu beobachten und beinhalten H3K4me3, insbesondere zu finden in Promotoren aktiv transkribierter Gene sowie an unmethylierten CpG-Inseln, H3K4me1 an aktiven *Enhancern* oder H3K9me2/3 und H3K27me3 an reprimierten Genen (Schleithoff *et al.*, 2012). Wie die Vielfalt dieser Modifikationen vermuten lässt, ist ihre Erzeugung und Aufrechterhaltung sehr komplex. Beteiligt daran sind unter

anderem Polycomb (*Polycomb group*, PcG) Proteine, die, organisiert in den beiden großen Multiprotein-Komplexen PRC1 (*Polycomb repressive complex*) und PRC2, über Histon-Modifikationen die Chromatin-Struktur beeinflussen und so zur Genabschaltung führen. PRC2 initiiert durch Trimethylierung an Lysin 27 des Histons H3 die Ausbildung einer repressiven Chromatin-Struktur (Margueron und Reinberg, 2011). PRC1 sorgt für kompaktes Chromatin und katalysiert die Monoubiquitylierung von Histon H2A. Auch wenn bereits viele Komponenten der Komplexe charakterisiert wurden, sind nicht alle Teilmechanismen bekannt und es kam jetzt auch die Beteiligung von nicht-kodierenden RNAs in den Focus (Margueron und Reinberg, 2011). Dies scheint auch für die Expressionsregulation des bereits beschriebenen *INK4b-ARF-INK4a* Locus zu gelten (Aguilo *et al.*, 2011). Es wurde postuliert, dass die lange, nicht-kodierende RNA *CDKN2BAS* durch Assoziation mit dem PcG-Protein CBX7 des PRC1 die Expression von p16^{INK4a} reprimiert (Yap *et al.*, 2010). *Knockdown* von *CDKN2BAS* war mit einer erhöhten Expression von p16^{INK4a} assoziiert, wohingegen die Expression von p15^{INK4b} unverändert blieb. Außerdem wurde eine Bindung von *CDKN2BAS* an SUZ12, eine Komponente des PRC2, nachgewiesen (Kotake *et al.*, 2011). Die Bindung von SUZ12 an den p15^{INK4b} Locus, die normalerweise eine Trimethylierung an H3K27 mit repressiver Wirkung zur Folge hat, wurde durch Depletion von *CDKN2BAS* gestört und es konnte ein Anstieg der Expression von p15^{INK4b} beobachtet werden, nicht jedoch von p16^{INK4a} und p14^{ARF}. In beiden Studien hatte das Fehlen von *CDKN2BAS* Einfluss auf die Expression der *INK4b-ARF-INK4a* Gene, jedoch wurden die Gene unterschiedlich reguliert. Somit ist trotz des Zusammenhangs zwischen *CDKN2BAS* und dem Polycomb-System unklar, welche Rolle die nicht-kodierende RNA in der Regulation ihrer Nachbargene spielt.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten die Pathomechanismen des Risiko-Locus für KHK und HI auf Chromosom 9p21.3 untersucht werden. Dieser Locus zeigte in vielen Studien ein deutliches Assoziationssignal, dennoch sind die zu Grunde liegenden zellulären Effekte der genetischen Region nicht klar. Die bisherigen Studien brachten bereits einige interessante und vielversprechende Hinweise, dennoch gibt es keine einheitlichen Befunde, gerade was den Einfluss der langen nicht-kodierenden RNA *CDKN2BAS* auf die Expression der benachbarten Gene betrifft. In den verschiedenen Untersuchungen wurde meist mit unterschiedlichen Zellsystemen gearbeitet und es wurden verschiedene mit KHK/HI assoziierte SNPs für die Definition risiko/nicht-risiko ausgewählt. Eine andere Herangehensweise war daher, diese Einteilung basierend auf einem Haplotyp aus mehreren stark assoziierten SNPs zu treffen. Außerdem sollte statt Einzelgenen die genomweite Genexpression untersucht werden. Dazu wurde das Zellsystem **humaner Monozyten/Makrophagen** sowohl aus gesunden Probanden als auch aus HI-Patienten gewählt, um eine definierte Zellpopulation zu analysieren, die eine wichtige Rolle in der Atherosklerose spielt. Um die zellulären Bedingungen des Krankheitsfortschritts *in vitro* zu simulieren, sollten Makrophagen mit atherogenen Substanzen behandelt werden. Neben einer Mischung aus **9cRA und T0901317** wurde eine Kombination aus **IFN γ und LPS** gewählt, um die atherosklerotischen Teilaspekte des gestörten Lipidstoffwechsels und der Entzündungsreaktion anzusprechen. Mit Hilfe von hochdichten Microarrays sollten **genomweite Expressionsdaten** erzeugt werden, die einen hohen Informationsgehalt über das gesamte Transkriptom humaner Makrophagen in behandeltem und unbehandeltem Zustand aufweisen. Auswertung der Daten auf Gen-Ebene sollten Gene oder möglicherweise Gensets identifizieren, die basierend auf dem 9p21.3 Risiko-Locus **differenziell exprimiert** sind. Dies sollte sowohl für die Zellen im Grundzustand untersucht werden als auch nach Stimulierung, um so mögliche Unterschiede in der Reaktion auf die atherogenen Substanzen und in den Mechanismen im Umgang mit den Stoffen aufgrund des **9p21.3 Haplotyps** aufzeigen zu können. Eine Analyse auf Exon-Ebene sollte einen Einblick in das **alternative Spleißmuster** der Zellen geben, wobei auf den Einfluss des Haplotyps ebenso geachtet werden sollte wie auf den Einfluss der atherogenen Stimulierungen. Zusätzlich zum genomweiten Ansatz sollten außerdem in humanen Monozyten der **Transkriptionsstart/Promotor von *CDKN2BAS*** und damit verbunden das **Methylierungsmuster** der genomischen DNA in den Promotorbereichen der Gene auf Chromosom 9p21.3 untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Expression und Regulation dieser Region zu bekommen.

2 Material und Methoden

2.1 Genotypisierung

Vier SNPs (rs7044859, rs496892 (=rs1292136), rs7865618, und rs1333049) wurden genotypisiert, die den ACAC risiko oder TTGG nicht-risiko Haplotyp darstellen (Schunkert *et al.*, 2008). Dazu wurde genomische DNA mit dem PureGene DNA Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aus Gesamtblut isoliert. Die DNA-Proben wurden mit Hilfe der 5' Exonuclease TaqMan Technologie (Life Technologies, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach Anweisungen des Herstellers genotypisiert. Jede Genotypisierung wurde mit 10 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 5 µl 1x Genotypisierungs-Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Endpunktbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers an einem Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR Gerät durchgeführt. Für die Zuordnung der Genotypen mittels allelischer Diskriminationsanalyse wurde die Sequence Detection System (SDS) Software Version 2.2.2. (Applied Biosystems) verwendet.

2.2 Patientenkollektiv

Eine Kohorte gesunder Probanden sowie eine Kohorte mit HI-Patienten wurden aus der bereits beschriebenen Deutschen Herzinfarkt Familienstudie (Broeckel *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2005) und dem Regensburger GoKard-Register rekrutiert. Die gesunde Gruppe ohne KHK umfasste 28 Männer entweder homozygot für den risiko (n=14) oder nicht-risiko Haplotyp (n=14). Raucher, Männer mit Diabetes oder älter als 65 Jahre wurden ausgeschlossen. Zusätzlich wurden 40 Herzinfarkt-Patienten (n=20 für jeden Haplotyp) nach denselben Kriterien eingeschlossen (Fenk, 2011; Höcherl, 2011). Der Ausschluss von Frauen, Diabetikern und Rauchern diente dazu, eine möglichst einheitliche Kohorte zur Untersuchung des genetischen Effektes von 9p21.3 mit möglichst wenigen äußeren Einflussfaktoren zu erhalten. Denn es ist bekannt, dass das Hormon Östrogen (Nathan und Chaudhuri, 1997), Diabetes sowie das Zellgift Nikotin (Ounpuu *et al.*, 2001; Yusuf *et al.*, 2004) das Herzinfarkt-Risiko verändern. Außerdem wurde das Einschlussalter auf ≤65Jahre festgelegt, da Monozyten und Makrophagen im höheren Lebensalter ihre Aktivität verändern und sich die Interaktion von Monozyten und dem vaskulären Endothel verstärkt, was die Entstehung von Atherosklerose begünstigt (Maier *et al.*, 1993).

Eine Untersuchung aller Studienteilnehmer beinhaltete eine Reihe von Labortests und klinischen Untersuchungen (siehe Tabelle 5 im Abschnitt 4.1). Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Regensburg genehmigt. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.3 PBMC-Isolierung, Stimulierung und Ernte der Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus Gesamtblut der Probanden über Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque PREMIUM Reagent (GE-Healthcare, Piscataway, NJ, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert. Ein Teil der PBMCs wurde in die Monozytenisolierung eingesetzt (siehe 2.4), der andere Teil der Zellen wurde in Macrophage-SFM Medium (Life Technologies, Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kultiviert und für 4 Tage in Gegenwart von 50 ng/ml rekombinantem menschlichen Makrophagenkolonien-stimulierendem Faktor (M-CSF) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in einer 5 % CO₂ Atmosphäre bei 37°C differenziert. Nachdem das Medium und nicht-adhärenente Zellen entfernt wurden, wurden die Makrophagen in frischem, mit M-CSF versetzten Medium inkubiert und für 24 h mit (1) 10 µM RA und 10 µM T0901317 oder (2) 50 ng/ml IFN γ und 100 ng/ml LPS stimuliert (alle Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Kontroll-Makrophagen wurden unbehandelt kultiviert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet.

2.4 Negativ-Selektion von Monozyten aus PBMCs

Die Monozyten wurden aus PBMCs gesunder Probanden (siehe 2.3) mittels *magnetic cell separation* (MACS) mit dem Monocyte Isolation Kit II, human (Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Angaben des Herstellers separiert. Zuerst wurden mit Hilfe von Pre-Separation Filtern (Porengröße 30 µm) Zellaggregate und größere Partikel aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen die zellspezifischen Oberflächenmoleküle CD3, CD7, CD16, CD56, CD123 und CD235a (Glycophorin A) sowie anti-Biotin MicroBeads inkubiert, so dass alle Zellen außer Monozyten, wie T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Basophile, magnetisch markiert wurden. Anschließend wurde die Mischung über eine Säule mit ferromagnetischer Matrix in einem starken Permanentmagnetfeld aufgetrennt, wobei die magnetisch markierten Zellen zurückgehalten wurden, während die nicht markierten Monozyten beim Durchfluss durch die Säule direkt eluiert wurden. Nach

Zellzählung wurden die Zellen bei -80°C gelagert und später für RNA-Isolierung (siehe 2.5) oder Isolierung genomischer DNA verwendet (siehe 2.12.1).

2.5 RNA-Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Aus Makrophagen bzw. Monozyten (siehe 2.3 bzw. 2.4) wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Überprüfung der Reinheit und Integrität der RNA-Proben erfolgte mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers unter Verwendung des RNA 6000 Nano LabChip Reagenziensets (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Hierzu wurde der Chip mit einer Mischung aus 32,5 µl Gelmatrix und 0,5 µl Farbstoffkonzentrat beladen, anschließend wurden in jede Vertiefung 5 µl des Markers zugegeben. Nach Denaturierung bei 70°C für 2 min wurde 1 µl des Größenstandards RNA 6000 Ladder bzw. je 1 µl der RNA-Proben auf den Chip gegeben. Jeder RNA LabChip enthält miteinander verbundene Mikrokanäle, über die RNA-Fragmente elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das sich daraus ergebende Peakmuster der Fragmente wird durch die *RNA integrity number* (RIN) widerspiegelt, welche von der Agilent 2100 Expert Software (Agilent Technologies) berechnet wird und zwischen 1 und 10 liegen kann, wobei eine niedrigere RIN stärker degradierte RNA anzeigt. Durch dieses Verfahren wird die Integrität der RNA nicht mehr nur durch das Verhältnis der ribosomalen Banden bestimmt, sondern durch das gesamte elektrophoretische Bild der RNA-Probe einschließlich möglicher Abbauprodukte. Um eine hohe Qualität der RNA sicherzustellen, wurden nur Proben mit einer RIN>6,5 für die weitere Microarray Analyse ausgewählt. Nach spektrophotometrischer Konzentrationsmessung (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurden die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

2.6 RNA-Prozessierung und Array Hybridisierung

Die Prozessierung der RNA-Proben wurde am lokalen Affymetrix Dienstleistungsanbieter „Kompetenzzentrum Fluoreszente Bioanalytik“ (KFB, Regensburg, Deutschland; www.kfb-regensburg.de/) durchgeführt. Der Ablauf ist in Abbildung 7 dargestellt.

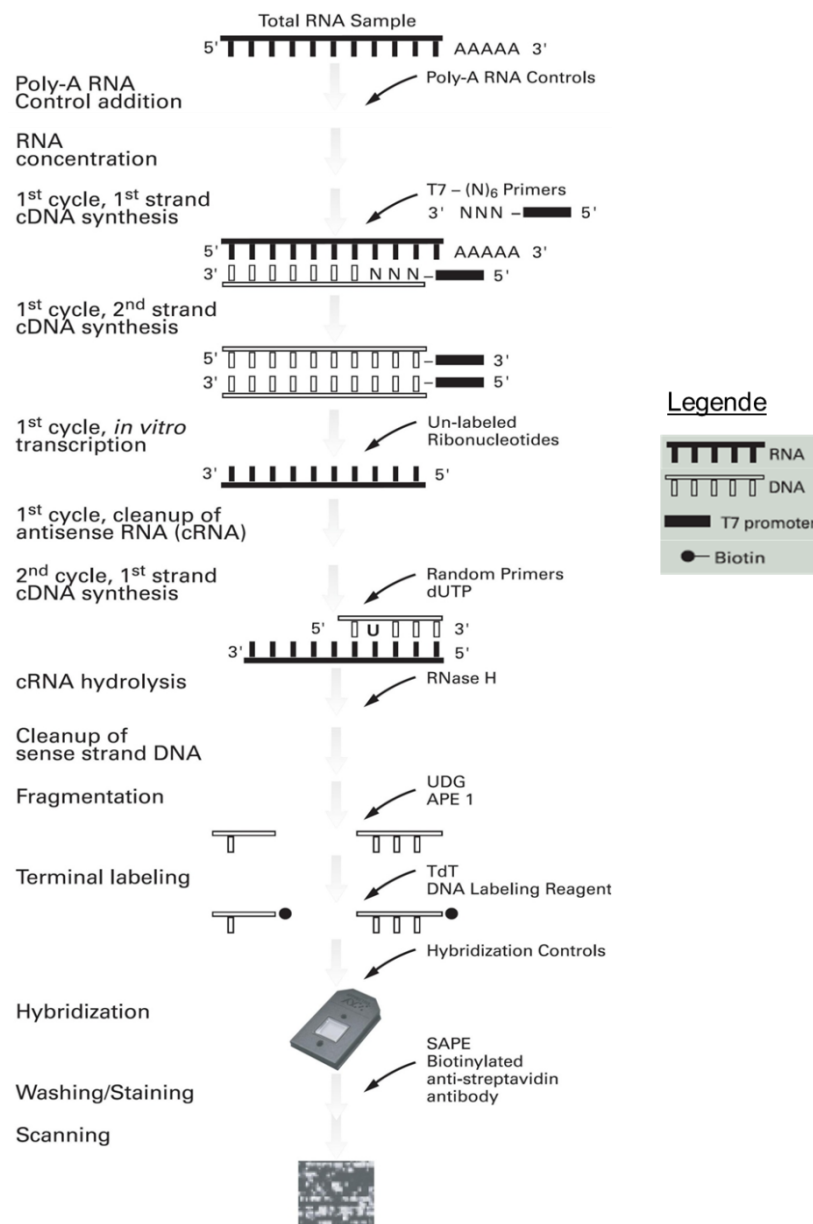


Abbildung 7: RNA-Prozessierung und Array-Hybridisierung.

Mehrere Schritte von reverser Transkription und *in vitro* Transkription führen zur Erzeugung einzelsträngiger DNA, die mit dem Array hybridisiert und Fluoreszenz-markiert wird. Die Messung der Fluoreszenzsignale ergibt Genexpressionsdaten der jeweils eingesetzten RNA-Proben (modifiziert nach www.affymetrix.com).

Die Probenvorbereitung für die Microarray-Hybridisierung erfolgte wie im Handbuch des Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) beschrieben. 300 ng der gereinigten Gesamt-RNA wurden verwendet, um doppelsträngige cDNA zu generieren, wobei über die verwendeten Zufalls-Hexamere eine T7-Promotor Sequenz eingebaut wurde. Eine initiale Verringerung der

ribosomalen RNA wurde nicht durchgeführt. Durch *in vitro* Transkription (IVT) mit Hilfe von T7 RNA-Polymerase wurde *antisense* orientierte cRNA synthetisiert und gereinigt (WT cDNA Synthesis and Amplification Kit, Affymetrix). Im nächsten Zyklus erfolgte in Gegenwart von unnatürlichen dUTP-Bausteinen die reverse Transkription in einzelsträngige (*single stranded*, ss) DNA, die nun wieder dem *sense*-Strang entsprach. Nach Spaltung der cRNA und einem Aufreinigungsschritt erfolgte die spezifische Fragmentierung der ssDNA mit einer Kombination der Enzyme Uracil DNA Glykosylase (UDG) und apurinisch/apyrimidinischer Endonuklease 1 (APE1), welche die eingebauten dUTPs erkennen und den DNA-Strang spalten. Anschließend erfolgte eine terminale Markierung der fragmentierten ssDNA mit biotinylierten Resten mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotid-Transferase (WT Terminal Labeling Kit, Affymetrix) und 4,95 µg dieser ssDNA wurden dann für die Hybridisierung mit dem Human Exon 1.0 ST Array für 16 h bei 45°C in einer Rotationskammer eingesetzt. Dabei diente die fragmentierte ssDNA als Target, um an komplementäre DNA-Sequenzen zu binden, die in Form von einzelsträngigen Oligonukleotid-Sonden als definierte Punkte auf der Array-Oberfläche fixiert sind. Die hybridisierten Arrays wurden in einer Affymetrix Washing Station FS450 gewaschen und gefärbt (Hyb Wash & Stain Kit, Affymetrix), wobei das in der Färbelösung enthaltene, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin markierte Streptavidin (SAPE) auf Grund seiner hohen Affinität zu Biotin an die ssDNA gebunden hat. Durch die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Punkts, an dem die Sonde angebracht ist, konnte die Menge einer bestimmten RNA indirekt ermittelt werden. Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des Affymetrix GeneChip Scanners 3000-7G gemessen.

2.7 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Vor der eigentlichen Auswertung erfolgte eine Qualitätskontrolle der Daten aller Arrays im Vergleich untereinander, um mögliche unerwünschte Ausreißer, die ihre Ursachen in der RNA-Prozessierung, Hybridisierung oder auch Erzeugung der Intensitätswerte haben können, aus der Analyse auszuschließen und so die Zuverlässigkeit der anschließend erzeugten Ergebnisse zu erhöhen.

2.7.1 Datenverarbeitung und Qualitätskontrolle

Die gescannten Fluoreszenzsignale der Arrays wurden mit der Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) zu einem Fluoreszenzintensitätswert pro Sonde umgewandelt. Die daraus resultierenden Affymetrix CEL-files wurden in das Programm Partek Genomics

Suite 6.5. (Partek Inc., St. Louis, MO, USA; www.partek.com) importiert. Die Intensitätswerte der einzelnen Sonden, die zu einem *Probeset* gehören, wurden gemittelt unter Anwendung des *robust multiarray analysis* (RMA) Algorithmus¹ einschließlich einer RMA *Background* Korrektur, Quantilsnormalisierung sowie log₂-Transformation. Daraus ergaben sich zwei Expressionsdatensätze, einer für die gesunden Probanden und einer für die HI-Patienten, wobei in keinem der beiden Ausreißer beobachtet wurden. Die Verteilung der Intensitätswerte auf den einzelnen Arrays ist in den Signalhistogrammen in Abbildung 8 dargestellt, die Box-Plots in Abbildung 9 zeigen die log-transformierten Intensitätswerte der Einzelsonden vor Aufsummierung und Normalisierung. Hier war bereits eine einheitliche Verteilung der jeweiligen Werte über alle Arrays hinweg zu beobachten. Nach der Normalisierung, bei der durch statistisches Schätzen und Herausrechnen von technischer Variation für die Vergleichbarkeit der Arrays untereinander gesorgt wird, zeigte sich eine äußerst einheitliche Verteilung der log-transformierten Expressionswerte (Abbildung 10).

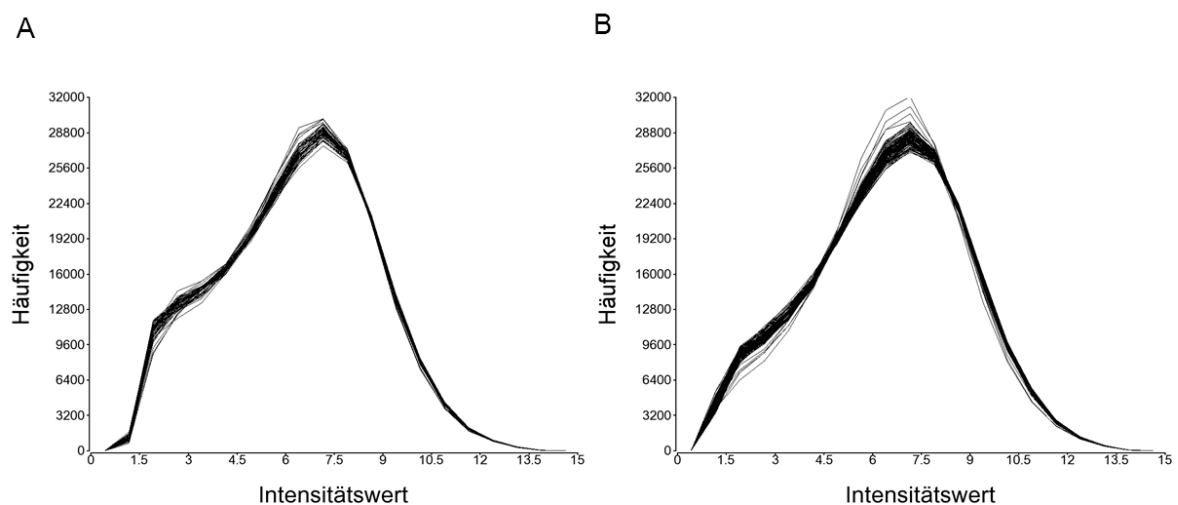


Abbildung 8: Signalhistogramme der einzelnen Arrays.

Für Makrophagen von gesunden Probanden (A) und HI-Patienten (B) sind die Intensitätswerte der einzelnen Arrays (x-Achse) gegen die jeweilige Häufigkeit (y-Achse) aufgetragen.

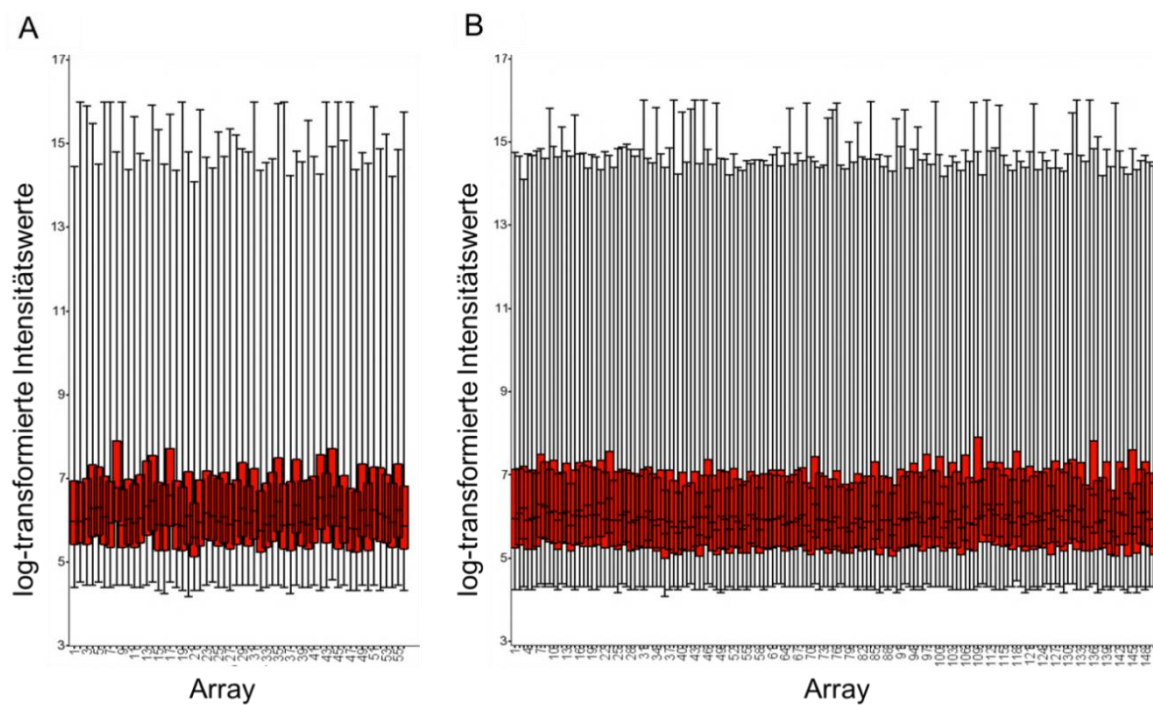


Abbildung 9: Box-Plots der log-transformierten Intensitätswerte.

Für Makrophagen von gesunden Probanden (A) und HI-Patienten (B) sind die log₂ transformierten Intensitätswerte der Einzelsonden für Aufsummieren und Normalisierung (y-Achse) für die einzelnen Arrays (x-Achse) als Box-Plots dargestellt.

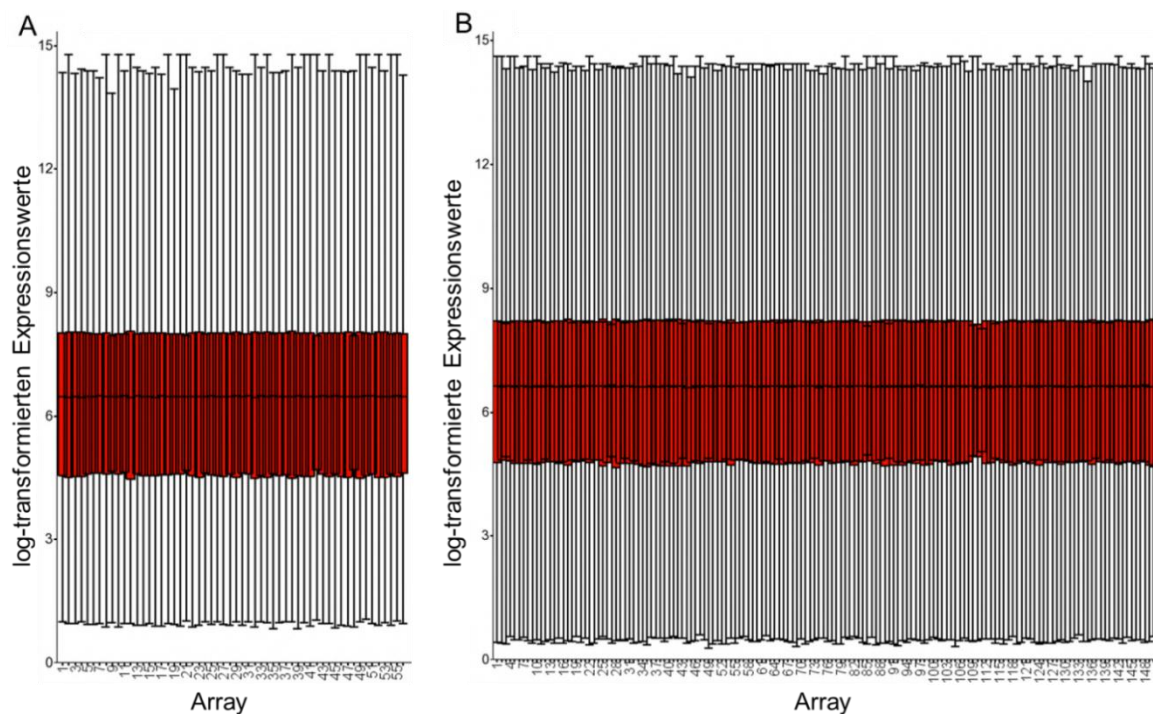


Abbildung 10: Box-Plots der log-transformierten Expressionswerte.

Für Makrophagen von gesunden Probanden (A) und HI-Patienten (B) sind die log₂ transformierten Expressionswerte (y-Achse) für die einzelnen Arrays (x-Achse) als Box-Plots dargestellt

Der Array enthält verschiedene Maße zur Beurteilung der Datenqualität, bei denen in dieser Studie keine Abweichungen von den erwarteten Werten auftraten. Ein gutes Kriterium für die allgemeine Datenqualität ist der Wert „pos_vs_neg_auc“, welcher die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) für eine *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurve angibt. Dabei werden positive (exonische) *Probesets* mit negativen (intronischen) *Probesets* von Referenzgenen verglichen, von denen bekannt ist, dass sie in vielen verschiedenen Proben konstitutiv exprimiert werden. Dieser Wert für die Unterscheidung zwischen Exons und Introns liegt typischerweise zwischen 0,8 und 0,9 für gute Datenqualität und umfasste in dieser Studie für alle Arrays Werte von 0,82 bis 0,91.

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) versucht durch die Definition neuer Variablen, den sogenannten Hauptkomponenten (*principal components*, PC), eine Reduktion der effektiven Dimension komplexer Daten zu erreichen. In Abbildung 11 sind für beide Datensätze jeweils die ersten drei PCs dargestellt, die für den größten Teil der Variation in den Originaldaten verantwortlich sind. Für die Daten der gesunden Probanden waren dies 35,9 % und für die der HI-Patienten 46,1 %. Dabei zeigte sich in beiden Kohorten bereits anhand der gesamten Signalintensitäten der einzelnen Arrays (entspricht den einzelnen unbehandelten oder behandelten Proben der Probanden) eine gute Auftrennung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen, jedoch war keine Gruppierung nach den Haplotypen zu erkennen.

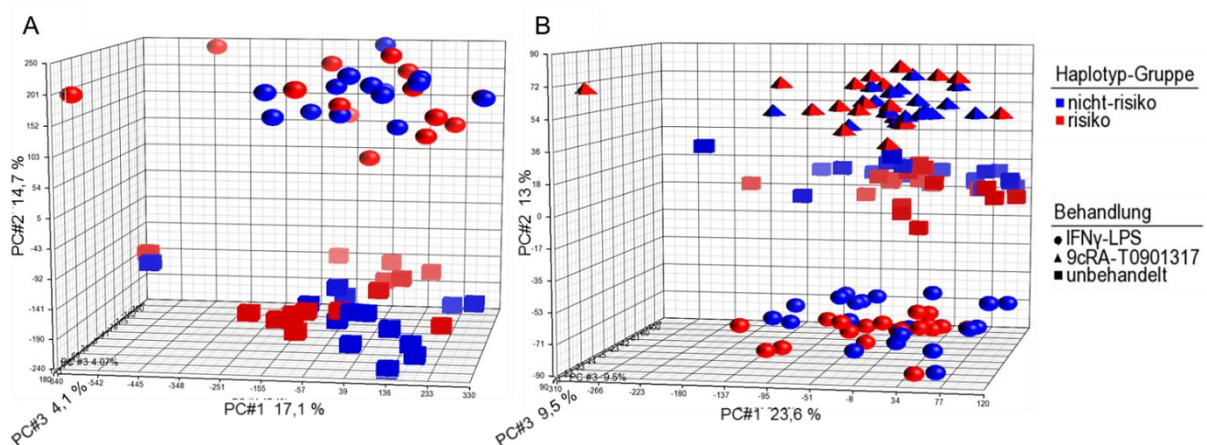


Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse der Expressionsdaten.

Für die Daten gesunder Probanden (A) und HI-Patienten (B) sind die ersten drei PCs auf der x-, y- und z-Achse dargestellt. Durch diese PCs ist eine Auftrennung der einzelnen Proben nach Behandlungsart (verschiedene Symbole) zu sehen, nicht jedoch nach Haplotyp-Gruppen (risiko in rot, nicht-risiko in blau dargestellt).

Für eine Analyse auf Gen-Ebene wurden alle detektierbaren *Probeset*-Werte, die zu einem Gen/Transkript (*Transcript Cluster*) gehören, zusammengefasst (Mittelwert), um einen Einzelwert für jedes *Transcript Cluster* zu erhalten. Ein *Transcript Cluster* bildet meistens ein Gen ab und enthält im Durchschnitt ein *Probeset* pro Exon, das wiederum aus meist vier Einzelsonden besteht. In dieser Studie wurde für die Datenauswertung das *core Meta-Probeset* verwendet, welches basierend auf NCBI Referenz Sequenzen und Vollängen mRNAs den höchsten zuverlässigen Annotations-Informationsgehalt hat und zum Zeitpunkt der Analyse 17.329 annotierte menschliche Gene beinhaltete (Referenzsequenz NCBI36/hg18, March 2006).

2.7.2 Statistische Verfahren

Um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt für „Haplotyp-Gruppe“, „Behandlung“, die Interaktion „Haplotyp-Gruppe*Behandlung“ und „Person“ als Faktoren (Eisenhart, 1947; Thompson, 1962). Die einzelnen Probanden („Person“) wurden als *random effects* eingeschlossen, um die gepaarte Situation zu berücksichtigen, die durch die Verwendung mehrerer Proben von der gleichen Person entsteht. Bei der Varianzanalyse wird untersucht, ob die ins Modell eingeschlossenen Faktoren (Einflussvariablen), hier also Haplotyp-Gruppen, Behandlungen oder die Kombination aus beiden (Interaktionsterm), die Varianz in der Expression der einzelnen Gene (Zielvariablen) erklären (Eisenhart, 1947). Es wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen, wodurch sich ermitteln lässt, ob sich die Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Da es sich bei der Varianzanalyse um einen globalen Test handelt, zeigt ein signifikanter p-Wert bei einem Faktor vorerst nur an, dass das Gen hinsichtlich dieses Faktors differenziell exprimiert war. Um weiter zu prüfen, zwischen welchen zwei Ausprägungen des Faktors (für „Behandlung“: unbehandelt, 9cRA-T0901317 und IFN γ -LPS) ein signifikanter Unterschied vorlag, wurden bereits bei der Erstellung des zu berechnenden ANOVA-Modells Kontraste für paarweise Vergleiche definiert (Tamhane und Dunlop, 2000). Diese Alternative zu *post-hoc* Tests ist ebenfalls in der Partek Genomics Suite 6.5 Software implementiert und erfordert lediglich die Eingabe der gewünschten Paar-Vergleiche, deren Mittelwertsdifferenzen dann auf Signifikanz geprüft werden. So ergab sich für jeden Paar-Vergleich jeweils ein x-facher Expressionsunterschied (*Fold Change*, FC) mit zugehörigem p-Wert, wobei FC immer als Mittelwerte für jede Gruppe angegeben sind. Da bei der Analyse von Microarray-Daten tausende Gene gleichzeitig untersucht werden und das Auftreten von

Falsch-Positiven (d.h. Genen, die fälschlicherweise als differenziell exprimiert bezeichnet werden, obwohl sie es nicht sind) proportional zu der Anzahl an durchgeführten Tests und dem Signifikanz-Niveau (p-Wert *Cutoff*) ist, muss für das multiple Testen korrigiert werden. Dazu wurde in dieser Arbeit die *false discovery rate* (FDR) verwendet, welche den erwarteten Anteil an falsch-positiven Ergebnissen innerhalb aller signifikanten Treffer kontrolliert, was bei einer FDR von 0,05 einem Anteil von 5 % und bei einer FDR von 0,2 einem Anteil von 20 % entspricht (Hochberg und Benjamini, 1990). Im Vergleich risiko vs. nicht-risiko im unbehandelten Zustand wurden Gene als signifikant betrachtet, wenn sie einen $FC < -1,5$ oder $FC > 1,5$ sowie einen mit einer FDR von 0,2 für multiples Testen korrigierten p-Wert aufwiesen. Für die Vergleiche behandelt vs. unbehandelt wurden aufgrund der starken Änderungen stringendere Bedingungen von einem $FC < -2$ oder $FC > 2$ sowie einem mit einer FDR von 0,05 korrigierten p-Wert gewählt. Neben dem FC der Genexpression zwischen behandelten und unbehandelten Zellen wurde für signifikant veränderte Gene das Verhältnis zwischen dem FC der risiko Gruppe zum FC der nicht-risiko Gruppe berechnet (*FC ratio* risiko/nicht-risiko), um die Unterschiede in der Regulation der Genexpression zwischen den Haplotypen beurteilen zu können. Für die Anhäufung von Genen aus Genfamilien wurden p-Werte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests einschließlich der Yates Kontinuitätskorrektur berechnet.

Zur Charakterisierung von Genlisten hinsichtlich gemeinsamer Zugehörigkeit von Gengruppen zu bestimmten biologischen Prozessen wurde mit Hilfe des Internettools *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery functional annotation tool* (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse durchgeführt (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b). Dabei wurde untersucht, ob in der Ergebnisliste Gene zugehörig zu einer sogenannten GO-Kategorie (*GO_biological process*) öfter auftraten als theoretisch zu erwarten wäre, hier im Vergleich zu allen auf dem Exon-Array abgebildeten Genen (*Background*: HuEx-1_0-st-v2).

$$\frac{\text{signifikante Gene in einer Kategorie}}{\text{alle signifikanten Gene}} \text{ vs. } \frac{\text{alle Gene in der Kategorie}}{\text{alle Gene auf dem Array}}$$

Daraus ergibt sich der sogenannte *Fold Enrichment Score*, der die Anreicherung von Genen einer bestimmten Kategorie beschreibt. Die Signifikanz der Anhäufung von Genen bestimmter biologischer Prozesse in den Ergebnissen wurde mit $p < 0,01$ festgelegt (Exakter Test nach Fisher, ohne Korrektur für multiples Testen). Für sowohl eine gute Abdeckung wie auch eine aussagekräftige Spezifität der Terminologie wurde Level 2 (GO-BP_2) für die

Analyse herangezogen. Von den fünf zur Verfügung stehenden Level bietet Level 1 die höchstmögliche Abdeckung der Gene in der Liste bei geringster Spezifität der GO-Kategorien. Mit ansteigendem Level sinkt die Abdeckung wobei dafür die GO-Kategorien spezifischer werden. Für die Praxis bietet Level 2 ein ausgewogenes Verhältnis von Abdeckung zu Spezifität (Dennis, Jr. *et al.*, 2003).

Alternatives Spleißen zwischen den Haplotyp-Gruppen wurde mit einem ANOVA-Modell auf Exon-Ebene untersucht, das in der Partek Genomics Suite 6.5 Software implementiert ist (Eisenhart, 1947). In das ANOVA-Modell wurden jeweils „Gruppe“, „Behandlung“ oder die Interaktion „Gruppe*Behandlung“ als alternativer Spleißfaktor eingeschlossen, um Exons zu identifizieren, die differenziell exprimiert waren entweder zwischen den Haplotyp-Gruppen in unbehandelten Zellen („Gruppe“) oder durch die Behandlung (Interaktionsterm) oder auch als genereller Effekt zwischen unbehandelten und behandelten Zellen („Behandlung“). Ein Exon wurde als alternativ gespleißt angesehen, wenn sich der Unterschied des Expressionslevels dieses Exons zwischen zwei Gruppen von dem anderer Exons des gleichen Gens unterschied, was als Interaktion zwischen *Probeset* und dem alternativen Spleißfaktor identifiziert wurde. Die Ergebnisse wurden aufsteigend nach p-Werten für alternatives Spleißen sortiert und jeweils die ersten 100 Einträge wurden manuell anhand geeigneter visueller Darstellung auf passende bekannte Annotationen überprüft ($p < 0,002$).

2.8 Technische Validierung mittels quantitativer PCR

Zur Validierung mit einer unabhängigen Methode wurden RNA-Proben in cDNA umgeschrieben, welche dann in die quantitative Real-Time PCR (qPCR) eingesetzt wurde. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte hierbei mittels Genexpressionsassays.

2.8.1 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem Affinity Script Multi Temperature System für reverse Transkription (Agilent Technologies) durchgeführt. In jeder Reaktion wurden 1-3 µg RNA (abhängig von der RNA-Konzentration) mit 0,3 µg nonameren Zufallsprimern in einem Gesamtvolumen von 15,7 µl bei 65°C für 5 min inkubiert. Nach 10-minütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 4,3 µl Master Mix zugegeben, der zusammengesetzt war aus 1x Affinity Script RT Buffer, 4 mM dNTP Mix, 20 Units RNase Block Ribonuclease Inhibitor und 1 µl Affinity Script Multi Temperature Reverse Transcriptase. Die Reaktion wurde bei 25°C

für 10 min inkubiert und anschließend bei 42°C für 60 min. Das Enzym wurde bei 70°C für 15 min hitzeinaktiviert. Nach Abkühlen der cDNA auf Eis wurde diese bei -20°C gelagert.

2.8.2 Durchführung und Auswertung der qPCR

qPCR Reaktionen wurden in 384-Well Platten in einem Endvolumen von 10 µl durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 10 ng cDNA, 1x Gene Expression Master Mix und 1x Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Genexpressionsassays mit Applied Biosystems Assay ID

| Gen | Symbol | Assay ID |
|--|---------------|---------------|
| <i>antisense noncoding RNA in the INK4 locus</i> | <i>ANRIL</i> | Hs01390879_m1 |
| <i>antisense noncoding RNA in the INK4 locus</i> | <i>ANRIL</i> | Hs01390880_m1 |
| <i>Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase</i> | <i>CASP5</i> | Hs00362078_m1 |
| <i>CD163 molecule</i> | <i>CD163</i> | Hs00174705_m1 |
| <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)</i> | <i>CDKN2A</i> | Hs00923894_m1 |
| <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)</i> | <i>CDKN2B</i> | Hs00394703_m1 |
| <i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i> | <i>ENPP2</i> | Hs00196470_m1 |
| <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> | <i>HPRT1</i> | Hs01003267_m1 |
| <i>Interleukin 1, beta</i> | <i>IL1B</i> | Hs00174097_m1 |
| <i>Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)</i> | <i>IL12B</i> | Hs01011518_m1 |
| <i>Metallothionein 1A</i> | <i>MT1A</i> | Hs00831826_s1 |
| <i>Metallothionein 1E</i> | <i>MT1E</i> | Hs01938284_g1 |
| <i>Metallothionein 1G</i> | <i>MT1G</i> | Hs01584215_g1 |
| <i>Metallothionein 1H</i> | <i>MT1H</i> | Hs00823168_g1 |
| <i>Metallothionein 1L (gene/pseudogene)</i> | <i>MT1L</i> | Hs01591331_g1 |
| <i>Metallothionein 1M</i> | <i>MT1M</i> | Hs00828387_g1 |
| <i>Metallothionein 2A</i> | <i>MT2A</i> | Hs01591333_g1 |
| <i>Norrie disease (pseudoglioma)</i> | <i>NDP</i> | Hs00181129_m1 |
| <i>TATA-box binding protein</i> | <i>TBP</i> | Hs00427620_m1 |

Die Genexpressionsassays enthalten nicht-markierte Oligonukleotide zur Amplifikation der cDNA und eine TaqMan-Sonde (Assay), welche innerhalb der Sequenz des jeweiligen Gens mit der cDNA hybridisiert. Am spezifischsten sind Sonden, die mit einer Exon-Exon Grenze überlappen (Assay-ID mit Index _m für *multiple exons*), da in diesem Fall möglicherweise

kontaminierende genomische DNA nicht detektiert werden kann (Lazaruk *et al.*, 2006). Bei Assays mit dem Index *_s* (*single exon*) sowie *_g* (detektieren funktionelle Gene aber auch nicht-transkribierte Pseudogene) kann dies der Fall sein, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen kann, sich jedoch bei manchen Genen nicht vermeiden lässt. Um die Spezifität der PCR-Amplifikation zu überprüfen, wurden geeignete Kontrollen mitgeführt, bei denen cDNA eingesetzt wurde, die ohne reverse Transkriptase „umgeschrieben“ wurde. Die Sonden tragen am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier FAM) und am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher, der die Emission von Reporter-Fluoreszenz unterdrückt (Livak *et al.*, 1995). Bei der Elongation in der PCR wird die an das Target hybridisierte TaqMan-Sonde durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut, wodurch der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und sich so vom Quencher entfernt. Die gemessene Zunahme der Reporter-Fluoreszenz zeigt demnach die Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts an (Holland *et al.*, 1991). Die PCR bestand aus einer 2-minütigen Inkubation bei 50°C und 10 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen für 15 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C in einem Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR Gerät. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der SDS Software Version 2.3 (Applied Biosystems), welche dann zur Auswertung in Excel exportiert wurden.

Die mittlere x-fache relative Änderung der Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta\text{Cp}$ -Methode (*crossing point*, Cp) berechnet (Pfaffl, 2001), wobei die Ergebnisse auf das Housekeeping Gen *TBP* (kodiert das TATA Box Bindeprotein) bzw. *HPRT1* (kodiert für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) standardisiert wurden (Referenzgen). *HPRT1* wurde für die Untersuchung der Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 gewählt, da es wie v.a. auch *CDKN2BAS* ebenfalls einen relativ hohen konstanten Cp-Wert aufwies. Als Kalibrator wurde entweder die unbehandelte Kontrolle (Vergleich behandelt vs. unbehandelt) oder die Risiko-Gruppe (bei Vergleich risiko vs. nicht-risiko) festgelegt.

$$\Delta\text{Cp Zielgen} = \text{Cp Zielgen} - \text{Cp Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Cp} = \Delta\text{Cp Zielgen} - \Delta\text{Cp Kalibrator}$$

$$\text{relative, x-fache Expressionsänderung (Fold Change)} = 2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$$

Mit den $\Delta\Delta\text{Cp}$ -Werten wurden t-Tests oder, wenn die Werte nicht normalverteilt waren (Shapiro-Wilk Test), Rangsummentests durchgeführt, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Haplotyp-Gruppen zu ermitteln. Für die absolute Quantifizierung von *IL12B* wurde eine bekannte Menge des amplifizierten Fragments in die PCR eingesetzt und anhand

dessen Molekulargewichts konnte so eine absolute Menge oder Anzahl an Molekülen für jeden Cp-Wert berechnet werden. T-Tests oder Rangsummentests wurden dann mit den Differenzen der Molekülzahlen zwischen behandeltem und unbehandeltem Zustand durchgeführt.

2.9 Zusammenstellung aller erhobenen Expressionsdaten

Expressionsdaten wurden mit genomweiten Expressionsarrays sowie der qPCR für einzelne Gene erhoben. Jedoch wurde nicht jeder Zelltyp und jede Behandlung für alle Probanden mit beiden Methoden untersucht. In Tabelle 2 sind die insgesamt vorliegenden Expressionsdaten zusammengefasst. Mit 9cRA-T0901317 behandelte Makrophagen der gesunden Probanden wurden nicht mit dem Exon-Array untersucht, jedoch wurde die Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 mit qPCR analysiert. In unbehandelten Monozyten (nur von gesunden Probanden isoliert) wurde lediglich die Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 mit qPCR untersucht.

Tabelle 2: Zusammenstellung aller erhobenen Expressionsdaten

| Zelltyp | Behandlung | Gesunde Probanden | | HI-Patienten | |
|-------------|-------------------|-------------------|---------------|--------------|---------------|
| | | Array * | qPCR 9p21.3 # | Array * | qPCR 9p21.3 # |
| Makrophagen | unbehandelt | √ | √ | √ | √ |
| | 9cRA-T0901317 | n.d. | √ | √ | √ |
| | IFN γ -LPS | √ | √ | √ | √ |
| Monozyten | unbehandelt | n.d. | √ | n.d. | n.d. |

* genomweite Expressionsdaten mittels Exon Array erhoben (inkl. qPCR-Validierung einzelner Gene für IFN γ -LPS Behandlung vs. unbehandelt)

Expressionsdaten der einzelnen Gene *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDKN2BAS* mittels qPCR und Genexpressionsassays erhoben

n.d., *not determined*, Daten wurden nicht erhoben

2.10 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *CDKN2BAS* wurde die Methode der 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) verwendet. Die 5'-RACE wurde mit dem SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Ausgehend

von Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der SMARTScribe reversen Transkriptase (RT) ein cDNA-Strang erzeugt. Wenn die RT das Ende des Strangs erreicht, hängt sie aufgrund ihrer terminalen Transferase Aktivität 3-5 Basen an das 3'-Ende des ersten cDNA Strangs an. Das SMARTer Oligonukleotid enthält einen Abschnitt modifizierter Basen, die an diese Verlängerung anlagern und so der RT als *Template* dienen. Das Enzym wechselt von der RNA zum SMARTer Oligonukleotid als *Template* und vervollständigt so den cDNA-Strang mit der zusätzlichen Sequenz des SMARTer Oligonukleotids am Ende. Dieser Schritt baut einen Adapter in jede vollständige cDNA ein, der im Weiteren als Bindestelle für den Universalprimer (Universal Primer A Mix, UPM) dienen kann. In Kombination mit einem Gen-spezifischen Primer (GSP) wurde das gewünschte Gen dann mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sowie die Bestandteile des UPM sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

2.10.1 cDNA-Synthese

811 ng RNA aus Monozyten eines gesunden Probanden, der homozygot für den 9p21.3 nicht-risiko Haplotyp war (siehe 2.5), wurden mit einem Mix aus 15-mer Zufallsprimern (Endkonzentration 2 µM in 10 µl) in einem Volumen von 3,75 µl für 3 min bei 72°C inkubiert, gefolgt von 2 min bei 22°C. Anschließend wurden 6,25 µl Master Mix zugegeben, der zusammengesetzt war aus 1x First-Strand Buffer, 2 mM DTT, 1 mM dNTP Mix, 10 Units RNase Inhibitor, 1,2 µM SMARTer II A Oligonukleotid und 10 Units SMARTScribe reverse Transkriptase. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion für 90 min bei 42°C inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70°C. Die so generierte cDNA wurde mit Tricine-EDTA Puffer 1:6 verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.10.2 PCR-Amplifizierung

Für die *outer*-PCR wurden 2,5 µl der cDNA mit 1x Advantage 2 PCR Buffer, 0,2 mM dNTP Mix, 1x UPM, 0,2 µM *reverse* GSP und 1x Advantage 2 Polymerase Mix in einem Gesamtvolumen von 50 µl inkubiert. Es wurde folgendes Touchdown-Programm verwendet: 5 Zyklen für 30 sec bei 94°C und 2 min bei 72°C, 5 Zyklen für 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 70°C und 2 min bei 72°C, 25 Zyklen für 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 68°C und 2 min bei 72°C. Nach Analyse eines Aliquots auf einem Agarosegel wurde der restliche PCR-Ansatz mit dem MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte in Wasser und die PCR-Produkte wurden mit Wasser 1:100 verdünnt. Davon wurde 1 µl in die *nested*-PCR in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt

zusammen mit 1x Advantage 2 PCR Buffer, 0,2 mM dNTP Mix, 1x UPM, 0,2 μ M *reverse nested*-GSP und 1x Advantage 2 Polymerase Mix. Das Temperaturprotokoll umfasste 30 Zyklen für 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 65°C und 2 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Banden mit erwarteter Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoTrap Gel Extraction Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers eluiert.

Tabelle 3: Primer für die PCR-Amplifizierung zur 5'-RACE von *CDKN2BAS*

| Name | Sequenz | T _M [°C] |
|-----------------------------|---|---------------------|
| GSP1 | TGCAGCAATAGGTGTGGGCCTCAGT | 66.3 |
| <i>nested</i> -GSP2 | TTGAAATGTCGTGGCAAATAGTCCTAGTCC | 65.4 |
| UPM <i>long</i> (RACE Kit) | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | 74 |
| UPM <i>short</i> (RACE Kit) | CTAATACGACTCACTATAGGGC | 58.4 |

2.10.3 Klonierung und Sequenzierung

Die Klonierung der Genfragmente erfolgte mittels TOPO TA Cloning (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Zur Ligation wurde 1 μ l des aufgereinigten PCR-Produkts mit 1 μ l Salt Solution und 1 μ l pCR2.1-TOPO Vektor in einem Gesamtvolumen von 6 μ l für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann zu einem Aliquot chemisch kompetenter Zellen (TOP10 *E. coli* F⁻ *mrcA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*, Invitrogen) gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C. Nach Zugabe von SOC-Medium konnten sich die Zellen für 1 h bei 37°C regenerieren, bevor sie auf LB_{Amp} Agar-Platten ausgebracht wurden, welche zuvor mit IPTG und X-Gal behandelt wurden (Blue-White Select Screening Reagent, Sigma-Aldrich). Nach Kultivierung über Nacht wurden weiße Kolonien in Flüssigmedium (LB_{Amp}) angeimpft und aus den über Nacht-Kulturen die Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (MACHEREY-NAGEL) nach Angaben des Herstellers isoliert. Im Testverdau mit *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) positive Klone wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit des Inserts überprüft (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, USA).

2.11 *In silico* Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Um den Unterschied der Sequenz des ermittelten 5'-Endes der 5'-RACE in Monozyten (siehe 2.10) im Vergleich zum annotierten 5'-Ende von *CDKN2BAS* besser beurteilen zu können, wurden mit Hilfe des Genomatix MatInspector (Release professional 8.0.5, March 2011) im Bereich des *core* Promotors die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt (Cartharius *et al.*, 2005). Für beide Sequenzen wurde jeweils eine 30 Basen umfassende Region *upstream* des Transkriptionsstarts (+1) auf das Vorkommen von allgemeinen Transkriptionsfaktor-Bindestellen aus Vertebraten hin untersucht und die Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Dieser Bereich lag für die Sequenz der 5'-RACE zwischen Position 21.994.792 und 21.994.821, für die RefSeq annotierte Variante zwischen Position 21.994.761 und 21.994.790.

2.12 Analyse des Methylierungsmusters genomischer DNA (EpiTYPER)

Es wurde nach einem vorläufigen Protokoll der Firma Sequenom (San Diego, CA, USA) gearbeitet (M. Rehli, persönliche Mitteilung). Wie in Abbildung 12 dargestellt, wurde zuerst genomische DNA mit Bisulfit behandelt, wobei nicht-methylierte Cytosine durch Desaminierung in Uracil umgewandelt wurden, während an der 5'-Position methylierte Cytosine jedoch unverändert blieben. Dies führte zu spezifischen Veränderungen in der DNA-Sequenz, die vom Methylierungsstatus abhängig waren. Anschließend wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert, wobei über den *reverse* Primer ein T7 RNA Polymerase Promotor für *in vitro* Transkription eingebaut wurde. Durch Zugabe von *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) wurden jegliche nicht eingebauten Nukleotide abgebaut. Damit für die basen-spezifische Spaltung nach T/U-Nukleotiden das Enzym RNase A verwendet werden konnte, wurden bei der *in vitro* Transkription geschützte dCTP Nukleotide verwendet, da RNase A nach C und U spaltet. In den Spaltungsprodukten erschienen die C/T Veränderungen durch die Bisulfit-Konvertierung der DNA als G/A Veränderungen, da der *reverse* Strang verwendet wurde. Eine solche Änderung erzeugte einen Massenunterschied von 16 Da pro CpG und konnte im Massenspektrometer als relative Methylierung durch Signalvergleich zwischen methylierten und nicht-methylierten *Templates* nachgewiesen werden.

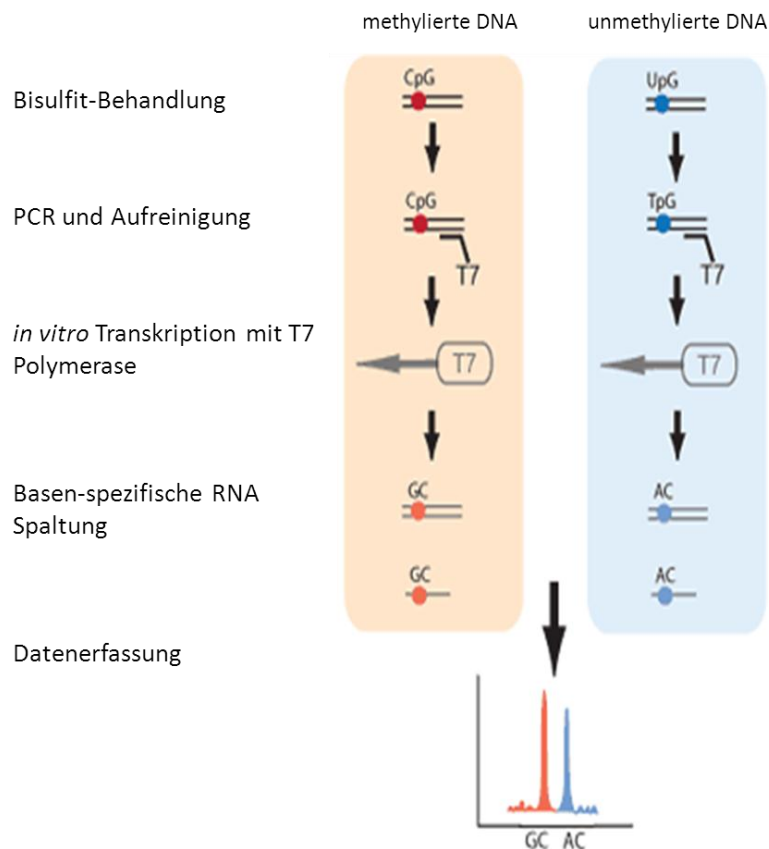


Abbildung 12: Schematischer Ablauf der Analyse des DNA-Methylierungsmusters.

Es sind die einzelnen Schritte dargestellt, die am Ende durch Detektion von Massenunterschieden eine Erfassung der DNA-Methylierung ermöglichen (modifiziert nach www.sequenom.com).

2.12.1 Isolierung genomischer DNA aus Monozyten

Aus den über MACS gewonnenen Monozyten gesunder Probanden (s. 2.2.4) wurde mit dem Blood & Cell Culture DNA Kit Mini (QIAGEN) die genomische DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde in EB-Puffer aufgenommen und für mehrere Stunden bei 37°C geschüttelt. Nach Konzentrationsbestimmung (Nanodrop) sowie Analyse mittels Agarosegel wurde die genomische DNA bei 4°C gelagert. Es wurden nur DNA-Proben mit ausreichender Konzentration und Qualität verwendet, so dass sich 11 DNA-Proben der Risiko-Gruppe und 12 DNA-Proben der nicht-risiko Gruppe für die Untersuchung des Methylierungsmusters ergaben.

2.12.2 Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA

Die Bisulfit-Konvertierung wurde mit dem EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) durchgeführt. Für die Konvertierung wurden 200 ng der genomischen DNA mit Wasser auf ein Volumen von 45 µl gebracht und mit 5 µl M-Dilution Buffer für 15 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 100 µl des vorbereiteten CT Conversion Reagents zugegeben und es folgten 20 Inkubations-Zyklen für 30 sec bei 95°C und 15 min bei 50°C. Nach Abkühlen auf Eis wurde die konvertierte DNA nach Angaben des Herstellers über Säulchen desulfoniert und aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 20 µl Wasser, um eine Konzentration von 10 ng/µl zu erhalten.

2.12.3 PCR-Amplifikation

Die zu untersuchenden Regionen umfassten die Promotor-Bereiche von *CDKN2A* und *CDKN2B*, einen möglichen alternativen Promotor für *CDKN2B* (Amplikon CDKN2BAS_8, im Intronbereich von *CDKN2BAS*) sowie die STAT1-Bindestelle in der Enhancer-Region (Harismendy *et al.*, 2011) im 9p21.3 Locus. Die Primerpaare sollten so gewählt werden, dass nach T-spezifischer Spaltung möglichst viele CpGs in Fragmenten mit eindeutig zuordenbaren Größen abgebildet waren. Nach einem Testlauf der Primer ergaben sich 13 Amplikons für die Analyse (Tabelle 4 und Abbildung 13).

Für die PCR-Amplifikation wurden jeweils 10 ng (=1 µl) der Bisulfit-konvertierten DNA mit 1x Hot Star Buffer, 200 µM dNTP Mix, je 0,2 µM *forward* und *reverse* Primer und 0,2 Units Hot Star Taq (QIAGEN) in einem Endvolumen von 5 µl inkubiert. Die PCR Reaktionen erfolgten in einer 384-Well Platte, die nach einer 4-minütigen Inkubation bei 94°C für 45 Zyklen für 20 sec bei 94°C, 30 sec bei 59°C und 1 min bei 72°C inkubiert wurde, gefolgt von einer 3-minütigen abschließenden Extension bei 72°C.

Zum Abbau nicht eingebauter Nukleotide wurden zu jeder Reaktion 0,3 µl SAP zugegeben und es folgte eine Inkubation für 20 min bei 37°C mit anschließender Hitzeinaktivierung für 5 min bei 85°C.

Tabelle 4: Amplikons für die Analyse des Methylierungsmusters

| Amplikon | forward Primer | reverse Primer | Größe [bp] | Anzahl CpGs | abgebildetes Fragment |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|-------------|--|
| CDKN2BAS_2 | TTTGTAGTTAAGGGGG TAGGAGTGG | AAATCACACCAAACAA AACAAATACC | 348 | 33 | Promotor-Bereich <i>CDKN2BAS</i> |
| CDKN2BAS_3 | GAAAATAAAAATGGGT TAGATATAAAGG | AAAATCTTCCATTCTTC AAACTAAA | 383 | 29 | |
| CDKN2BAS_4 | TTTTTTGTTTTTAGTT GGAAAGGA | TCCTTTATATCTAACCC ATTTTTATTTTC | 355 | 29 | |
| CDKN2BAS_5 | TGATTTTTGAGGTGGG TTTGAAGTTT | TTCCTAAAAAACCAAAT AAAAAAAACCCCT | 272 | 13 | |
| CDKN2BAS_6 | AGTTTTTTGTGTTTAGT TTATTTTTATTTT | TACTTTTACTATTCCCA AACAAAACC | 386 | 29 | |
| CDKN2BAS_8 | TGGAAGAGTGAAGGTTT AATAATGTTATTT | AAATCTACCATCCTCTT TTTCTTCAAC | 304 | 10 | möglicher alternativer Promotor <i>CDKN2B</i> |
| CDKN2B_1 | GTTTGGATTGTTTTTG GGAAAAAG | AACAATACAACCAACA TTCCTAAC | 333 | 31 | Promotor-Bereich <i>CDKN2B</i> |
| CDKN2B_2 | TTTTTTTTAGGAGATTTG GGTTTAGTTTTA | CCTAACATCTTTAAACA AACTTCCCC | 410 | 41 | |
| ECAD9_1 | GATTTTTGGTTTTGATA TGGTTAG | CACAATCCCACATTTTA AAAACATT | 492 | 4 | Enhancer mit STAT1-Bindestelle |
| ECAD9_2 | ATTATTGTATAAATGTG ATTGTTTTTGAT | AATAAACTACTAACTCTA AAAATCATACCC | 356 | 3 | |
| ECAD9_3 | TGATGTGAGTATATGT GTGTGTGTATA | TTTATAATAATTTCTCAT CACTTAACCTCT | 499 | 6 | |
| ECAD9_5 | GAGGTTAAGTGATGAGA AATTATTATAAAA | AAAACCAAACAAAATA TAAAACAAATCAA | 185 | 3 | |
| ECAD9_6 | TAAATGTGATTGTTTTT GTATATTTTTGTT | CATTTTAAACCAAACC ATTTTATCTTACT | 485 | 3 | |

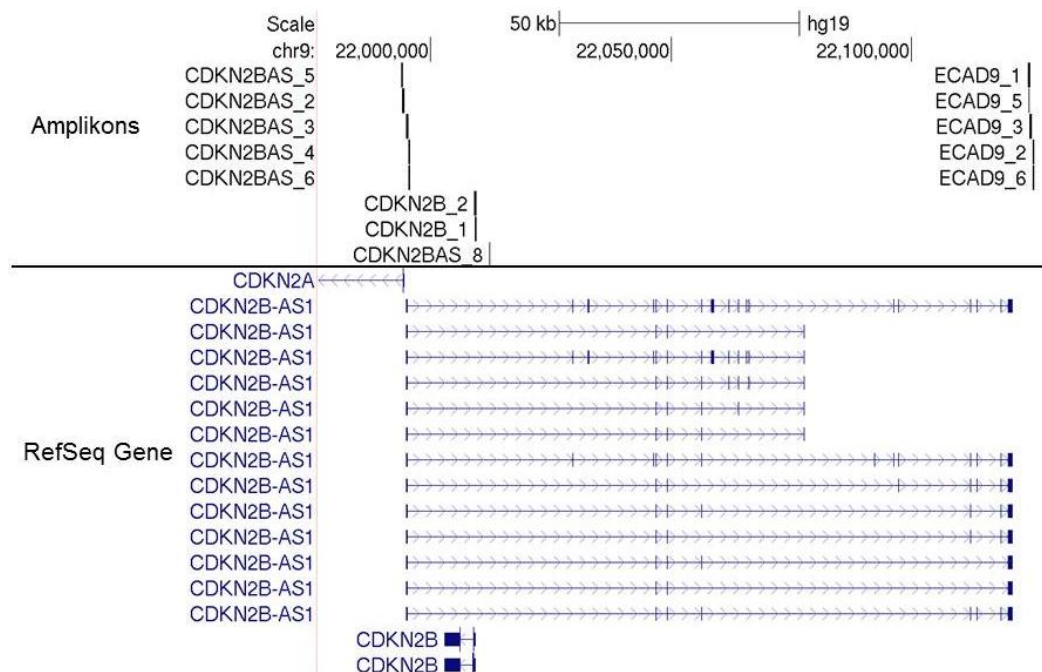


Abbildung 13: Amplikons für die Analyse des Methylierungsmusters.

Im unteren Teil sind die RefSeq Varianten der Gene *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDKN2BAS* abgebildet, im oberen Bereich die Bezeichnungen und die Lage der untersuchten Amplikons.

2.12.4 In vitro Transkription und T-spezifische Spaltung mit RNase A

Jeweils 2 µl der PCR/SAP Reaktion wurden mit 5 µl des T-Cleavage Cocktails gemischt. Dieser enthielt 1x T7 Polymerase Puffer, Cleavage Mix (T mix), 4,4 mM DTT, 4 Units T7 R&DNA Polymerase und RNase A. Die Reaktion wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Entsalzung der Produkte durch Zugabe von CLEAN resin und Zentrifugation. Der Überstand wurde in die massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

2.12.5 Transfer auf einen SpectroCHIP und massenspektrometrische Analyse

Mit Hilfe von Kapillaren (MassARRAY Nanodispenser) wurden etwa 25 nl der Proben auf einen 384 SpectroCHIP aufgebracht. Außerdem wurde ein Kalibrant an den entsprechenden Positionen aufgebracht, der als Größenstandard diente. Zur massenspektrometrischen Analyse mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) wurde der Chip in den MassARRAY Reader eingebracht und nach Erzeugung des Vakuums beschossen.

2.12.6 Analyse der Methylierungsdaten

Für jedes untersuchte Amplikon ergab sich in jeder der eingesetzten DNA-Proben ein relativer Wert der mittleren Methylierung aller in dem Fragment enthaltenen CpGs zwischen 0 und 100 %. Zur Auswertung wurden nur die Werte herangezogen, die eindeutig zugewiesen werden konnten und nicht von beispielsweise solchen Fragmenten stammten, die mit anderen in ihrer Größe übereinstimmten. Die beiden Haplotyp-Gruppen wurden verglichen, indem für jedes CpG/jede CpG-Gruppe und für jedes Amplikon Mittelwerte für die risiko und nicht-risiko Gruppen berechnet wurden. Um die Signifikanz des Unterschiedes zu ermitteln, wurden sowohl für die einzelnen CpGs als auch für die Mittelwerte pro Amplikon mit den Einzelwerten der beiden Gruppen t-Tests, oder wenn die Werte nicht normalverteilt waren (Shapiro-Wilk Test), Rangsummentests durchgeführt. Es wurde die Schwelle für nominelle Signifikanz ohne Berücksichtigung des multiplen Testens von $p < 0,05$ herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Studienteilnehmer und Baseline Charakteristika

Insgesamt wurden 28 gesunde Probanden und 40 Herzinfarkt-Patienten in die Studie eingeschlossen (siehe 2.2). Um ein möglichst einheitliches Kollektiv zu erhalten, wurden nur Männer ≤ 65 Jahre ausgewählt. Ausgeschlossen wurden ebenfalls Diabetiker und aktuelle Raucher. In den beiden Kohorten war jeweils die eine Hälfte der Probanden homozygot für den 9p21.3 risiko (ACAC) Haplotyp, die andere für den nicht-risiko (TTGG) Haplotyp, so dass eine maximale Stratifikation auf den zu erwartenden genetischen Effekt gegeben war. Der Vergleich der Baseline Charakteristika zwischen den beiden Haplotyp-Gruppen jeweils innerhalb einer der beiden Kohorten zeigte ein sehr einheitliches Bild und wies mit Ausnahme des Einschlussalters bei den Herzinfarkt-Patienten ($p=0,002$) keine signifikanten Unterschiede auf (Tabelle 5). Erfasst wurden anthropometrische und klinisch relevante Daten, die Geschichte koronarer Ereignisse sowie wichtige Serumparameter und die Medikation der Probanden.

Tabelle 5: Baseline Charakteristika der Studienteilnehmer

| Variable | Gesunde Kohorte | | | | HI Kohorte | | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | gesamt (n=28) | risiko (n=14) | nicht- risiko (n=14) | p-Wert risiko vs. nicht- risiko | gesamt (n=40) | risiko (n=20) | nicht- risiko (n=20) | p-Wert risiko vs. nicht- risiko |
| <i>Anthropometrische Daten</i> | | | | | | | | |
| BMI, kg/m ² (Bereich) | 29,4 ± 4,1 (22,9-42,8) | 29,9 ± 4,7 (24,8-42,8) | 28,9 ± 3,4 (22,9-34,4) | n.s. | 30,3 ± 4,0 (22,9-38,0) | 29,9 ± 4,0 (22,9-37,0) | 30,6 ± 4,0 (24,5-38,0) | n.s. |
| Männer, n (%) | 28 (100) | 14 (100) | 14 (100) | n.s. | 40 (100) | 20 (100) | 20 (100) | n.s. |
| Gewicht, kg (Bereich) | 94,5 ± 15,7 (74,1-146,4) | 98,4 ± 18,8 (76,7-146,4) | 90,5 ± 11,3 (74,1-116,6) | n.s. | 93,1 ± 13,8 (64,7-120,3) | 93,6 ± 14,6 (64,7-119,9) | 92,6 ± 13,3 (74,5-120,3) | n.s. |
| Einschlussalter, Jahre (Bereich) | 55,3 ± 6,5 (45,0-65,0) | 53,8 ± 6,0 (45,0-63,0) | 56,7 ± 6,3 (47,0-65,0) | n.s. | 56,6 ± 6,3 (42,0-65,0) | 53,7 ± 5,0 (45,0-61,0) | 59,5 ± 6,2 (42,0-65,0) | 0,002 |
| <i>Geschichte</i> | | | | | | | | |
| Perkutane transluminale Koronarangioplastie, n (%) | 0 (0) | - | - | - | 35 (88) | 18 (90) | 17 (80) | n.s. |
| Koronararterien-Bypass, n (%) | 0 (0) | - | - | - | 8 (20) | 2 (10) | 6 (30) | n.s. |
| Schlaganfall, n (%) | 0 (0) | - | - | - | 4 (10) | 2 (10) | 2 (10) | n.s. |
| Zeit seit dem letzten koronaren Ereignis, Jahre (Bereich) | - | - | - | - | 4,8 ± 5,0 (0-17) | 4,6 ± 5,2 (0-14) | 5,0 ± 5,0 (1-17) | n.s. |
| Nikotinabusus in der Vergangenheit, n (%) | 15 (54) | 7 (50) | 8 (57) | n.s. | 29 (73) | 15 (75) | 14 (70) | n.s. |
| Familiengeschichte von KHK in nahen Verwandten, n (%) | 25 (89) | 12 (86) | 13 (93) | n.s. | 30 (77) | 13 (65) | 16 (84) | n.s. |

| Variable | Gesunde Kohorte | | | | HI Kohorte | | | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| | gesamt (n=28) | risiko (n=14) | nicht- risiko (n=14) | p-Wert risiko vs. nicht- risiko | gesamt (n=40) | risiko (n=20) | nicht- risiko (n=20) | p-Wert risiko vs. nicht- risiko |
| <i>Klinische Daten</i> | | | | | | | | |
| Puls, Schläge/Minute (Bereich) | 72 ± 12 (54-101) | 73 ± 15 (54-101) | 70 ± 8 (58-83) | n.s. | 66 ± 10 (48-90) | 65,4 ± 8,9 (52-86) | 67,3 ± 10,9 (48-90) | n.s. |
| Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, % (Bereich) | 58,9 ± 6,7 (35,0-71,0) | 57,3 ± 7,9 (35,0-65,3) | 60,4 ± 5,1 (49,0-70,6) | n.s. | 52,3 ± 11,0 (20,0-74,4) | 50,8 ± 11,9 (20,0-67,2) | 54,1 ± 10,1 (40,0-74,4) | n.s. |
| Systolischer Blutdruck, mmHg (Bereich) | 140 ± 15 (115-175) | 142 ± 17 (115-175) | 138 ± 13 (115-160) | n.s. | 130 ± 15 (95-155) | 127 ± 16 (95-155) | 133 ± 13 (115-155) | n.s. |
| <i>Serumparameter</i> | | | | | | | | |
| Glukose, mg/dl (Bereich) | 98 ± 11 (77-125) | 99 ± 9 (89-125) | 98 ± 13 (77-122) | n.s. | 105 ± 12 (85-144) | 102 ± 9 (86-121) | 108 ± 13 (85-144) | n.s. |
| CRP, mg/l (Bereich) | 2,2 ± 3,6 (0,5-20,2) | 1,4 ± 0,8 (0,5-3,3) | 2,8 ± 5,1 (0,5-20,2) | n.s. | 2,3 ± 3,0 (0,5-16,3) | 2,2 ± 2,3 (0,5-8,5) | 2,4 ± 3,6 (0,5-16,3) | n.s. |
| HbA1c, % (Bereich) | 5,8 ± 0,3 (5,3-6,4) | 5,7 ± 0,4 (5,3-6,4) | 5,7 ± 0,3 (5,3-6,2) | n.s. | 6,0 ± 0,4 (5,1-6,7) | 5,9 ± 0,4 (5,1-6,7) | 6,0 ± 0,3 (5,3-6,6) | n.s. |
| Cholesterin, mg/dl (Bereich) | 212,2 ± 35,8 (162,0-303,0) | 213,4 ± 32,5 (182,0-282,0) | 211,0 ± 40,1 (162,0-303,0) | n.s. | 185,9 ± 30,0 (126,0-260,0) | 190,6 ± 28,9 (136,0-260,0) | 181,5 ± 31,1 (126,0-231,0) | n.s. |
| HDL-C, mg/dl (Bereich) | 50,1 ± 11,7 (36,0-77,0) | 49,9 ± 13,6 (36,0-77,0) | 50,4 ± 9,9 (36,0-68,0) | n.s. | 51,1 ± 10,6 (31,0-78,0) | 52,8 ± 12,5 (31,0-78,0) | 49,4 ± 8,2 (31,0-70,0) | n.s. |

| Variable | Gesunde Kohorte | | | | HI Kohorte | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
| | gesamt (n=28) | risiko (n=14) | nicht- risiko (n=14) | p-Wert risiko vs. nicht- risiko | gesamt (n=40) | risiko (n=20) | nicht- risiko (n=20) | p-Wert risiko vs. nicht- risiko |
| <i>Serumparameter (Fortsetzung)</i> | | | | | | | | |
| LDL-C, mg/dl (Bereich) | 138,6 ± 31,2 (85,0-216,0) | 140,4 ± 27,1 (105,0-199,0) | 136,8 ± 35,7 (85,0-216,0) | n.s. | 105,2 ± 27,5 (63,0-164,0) | 107,1 ± 26,6 (72,0-152,0) | 130,3 ± 28,9 (63,0-164,0) | n.s. |
| Lp(a), mg/dl (Bereich) | 22,6 ± 20,0 (9,8-84,9) | 25,3 ± 25,1 (9,8-84,9) | 19,9 ± 13,5 (9,8-46,1) | n.s. | 37,5 ± 29,3 (9,8-117,0) | 38,8 ± 30,6 (9,8-98,9) | 36,2 ± 28,8 (9,8-117,0) | n.s. |
| <i>Medikamente</i> | | | | | | | | |
| Gerinnungshemmer, n (%) | 6 (21) | 3 (20) | 3 (20) | n.s. | 36 (90) | 19 (95) | 17 (80) | n.s. |
| Betablocker, n (%) | 5 (18) | 1 (7) | 4 (29) | n.s. | 32 (80) | 16 (80) | 16 (80) | n.s. |
| ACE Hemmer, n (%) | 10 (36) | 6 (43) | 4 (29) | n.s. | 28 (70) | 15 (75) | 13 (65) | n.s. |
| Statine, n (%) | 7 (25) | 4 (29) | 3 (20) | n.s. | 35 (88) | 17 (85) | 18 (90) | n.s. |
| Phenprocoumon, n (%) | 1 (4) | 0 (0) | 1 (7) | n.s. | 3 (8) | 0 (0) | 3 (15) | n.s. |

Werte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung oder Anzahl (Anteil in Prozent)

BMI, *body mass index*; CRP, C-reactives Protein; HbA1c, Hämoglobin A1c; HDL-C, *high-density lipoprotein cholesterol*; LDL-C, *low-density lipoprotein cholesterol*; Lp(a), Lipoprotein (a); ACE Hemmer, *angiotensin converting enzyme* Hemmer

3.2 Genomweites Expressionsprofil von Makrophagen stratifiziert nach 9p21.3 Haplotypen

Um den Einfluss des 9p21.3 Risiko-Locus auf die Atherosklerose zu untersuchen, wurde mit Hilfe von RNA aus humanen Makrophagen mit Human Exon 1.0 ST Arrays (Affymetrix) das genomweite Genexpressionsprofil dieser Zellen ermittelt (siehe 2.3 und 2.5 bis 2.7). Nach Generierung der Expressionswerte und Qualitätskontrolle der Daten wurde eine ANOVA zur Detektion von differenziell exprimierten Genen durchgeführt. Obwohl die p-Werte mit einer weniger stringenten FDR von 0,2 korrigiert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen Trägern des 9p21.3 risiko und nicht-risiko Haplotyps bei den gesunden Probanden. Bei den HI-Patienten traten einige signifikante Unterschiede auf (FDR=0,2), welche in Tabelle 6 aufgelistet sind. Darunter fanden sich beispielsweise die beiden Chemokin-Liganden *CCL2* und *CCL8* sowie zwei C-Typ Lektine, *CLEC4E* und *CLEC5A*, höher exprimiert in HI-Patienten, die den Risiko-Haplotyp trugen im Vergleich zu Trägern des nicht-risiko Haplotyps.

Tabelle 6: Haplotyp-spezifische Expressionsunterschiede in unbehandelten Makrophagen von HI-Patienten mit Risiko-Haplotyp im Vergleich zu Trägern des nicht-risiko Haplotyps.

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | Beschreibung | p-Wert * | Fold Change * |
|----------------|-----------------------|---|----------|---------------|
| <i>CCL8</i> | 3718191 | <i>chemokine (C-C motif) ligand 8</i> | 0,001 | 2,31 |
| <i>SUMO1P3</i> | 2363074 | <i>SUMO1 pseudogene 3</i> | 0,004 | 1,72 |
| <i>SLC7A11</i> | 2786322 | <i>solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11p</i> | 0,005 | 1,63 |
| <i>CLEC4E</i> | 3443183 | <i>C-type lectin domain family 4, member E</i> | 0,010 | 1,61 |
| <i>CCL2</i> | 7385547 | <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i> | 0,004 | 1,61 |
| <i>CLEC5A</i> | 3076868 | <i>C-type lectin domain family 5, member A</i> | 0,010 | 1,52 |
| <i>GPR174</i> | 3982612 | <i>G protein-coupled receptor 174</i> | 0,020 | -1,55 |
| <i>GCNT4</i> | 2862841 | <i>glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2</i> | 1,14E-05 | -1,66 |

* risiko vs. nicht-risiko Haplotyp

3.3 Stimulierung der Makrophagen mit 9cRA und T0901317

Makrophagen der Herzinfarkt-Patienten wurden *in vitro* mit den atherogenen Substanzen 9cRA und T0901317 behandelt (siehe 2.3). Es zeigten sich deutliche Änderungen des genomweiten Genexpressionsprofils mit insgesamt 320 signifikant hoch- und 191 signifikant herunterregulierten Genen (Abbildung 14). Bekannte Effekte der verwendeten Substanzen, wie beispielsweise eine Hochregulation der ABC-Transporter *ABCA1* ($FC=6,63$, $p<10^{-50}$) und *ABCG1* ($FC=9,25$, $p<10^{-50}$), waren wie zu erwarten deutlich zu sehen.

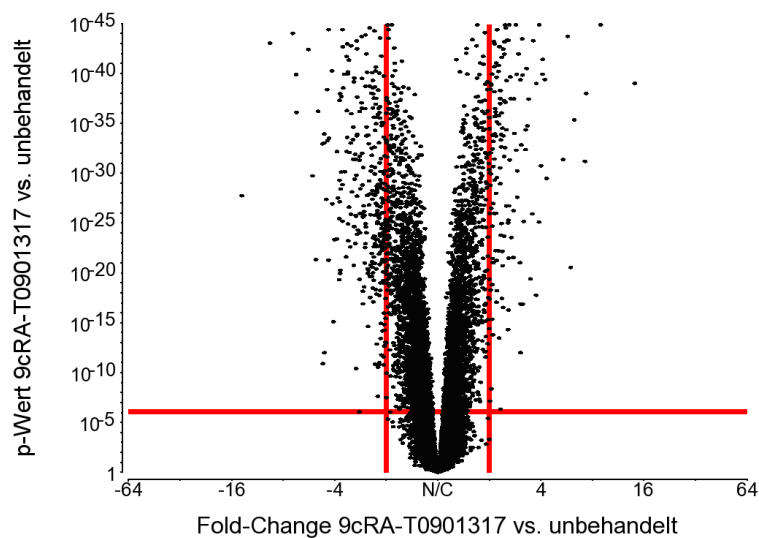


Abbildung 14: Effekt der 9cRA-T0901317 Stimulierung auf die Genexpression in Makrophagen (HI-Patienten).

Im Volcanoplot ist die x-fache Genexpressionsänderung zwischen behandelten ($n=40$) und unbehandelten ($n=40$) Zellen (x-Achse; N/C=no change) gegen den zugehörigen p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Gen/*Transcript Cluster*. Die roten Linien markieren die Signifikanzbereiche $FC<-2$ bzw. $FC>2$ und mit einer FDR von 0,05 korrigierte p-Werte (*Cutoff* $p<8,8\cdot10^{-7}$).

Ein Vergleich zwischen den beiden Haplotyp-Gruppen ergab lediglich ein signifikant differenziell exprimiertes Gen (Abbildung 15, Tabelle 7): *EMR3* war in Trägern des Risiko-Haplotyps 2-fach niedriger exprimiert als in HI-Patienten mit dem nicht-risiko Haplotyp.

Genomweite Genexpressionsdaten von Makrophagen gesunder Probanden wurden für diese Stimulierung nicht erhoben.

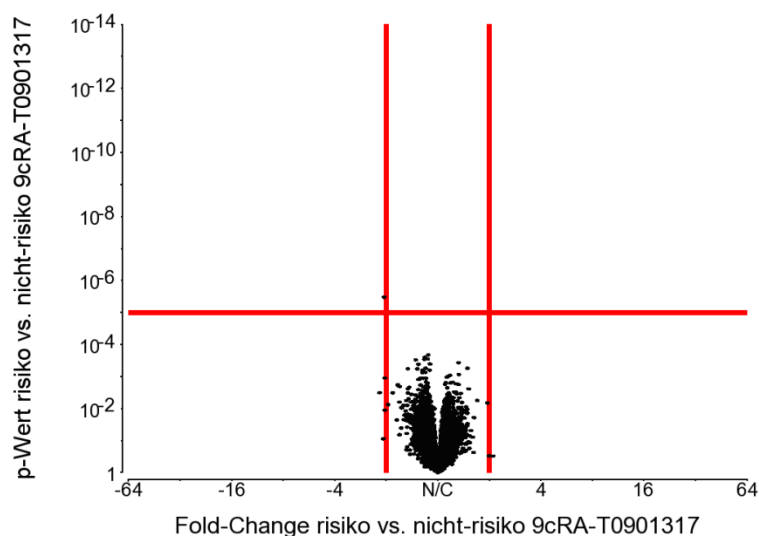


Abbildung 15: Unterschiede des Effekts der 9cRA-T0901317 Stimulierung zwischen den beiden Haplotyp-Gruppen (HI-Patienten).

Die x-fache Genexpressionsänderung zwischen risiko (n=20) und nicht-risiko (n=20) (x-Achse; N/C=no change) ist gegen den zugehörigen p-Wert aufgetragen (y-Achse). Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Gen/Transcript Cluster. Die roten Linien markieren die Signifikanzbereiche $FC < -2$ bzw. $FC > 2$ und mit einer FDR von 0,2 korrigierte p-Werte (Cutoff $p < 1 \cdot 10^{-5}$).

Tabelle 7: Haplotyp-spezifischer Expressionsunterschied in mit 9cRA-T0901317 behandelten Makrophagen von HI-Patienten mit Risiko-Haplotyp im Vergleich zu Trägern des nicht-risiko Haplotyps.

| Gen-Symbol | Transcript cluster ID | Beschreibung | p-Wert * | Fold Change * |
|-------------|-----------------------|--|----------|---------------|
| <i>EMR3</i> | 3852832 | <i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 3</i> | 3,32E-06 | -2,06 |

* risiko vs. nicht-risiko Haplotyp

3.4 Stimulierung der Makrophagen mit IFN γ und LPS

In vitro Behandlung der Makrophagen von gesunden Probanden und HI-Patienten mit einem pro-inflammatorischen Cocktail aus IFN γ und LPS (siehe 2.3) zeigte einen deutlichen Einfluss auf das genomweite Genexpressionsprofil und führte zur Hochregulation von mehreren Interleukinen, Chemokin-Liganden und anderen bekannten inflammatorischen Markern. Beispielsweise wies *IL6* in stimulierten Makrophagen von HI-Patienten eine 26-fache Expressionserhöhung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf ($p < 10^{-50}$), *CCL4* eine 8-fache ($p = 1,7 \cdot 10^{-37}$) und die Expression von IFN γ war um den Faktor 5 erhöht ($p = 2,2 \cdot 10^{-35}$). In Zellen aus gesunden Probanden waren die Effekte ähnlich (*IL6* FC=11, $p = 5,2 \cdot 10^{-13}$; *CCL4* FC=4, $p = 4,6 \cdot 10^{-16}$; IFN γ FC=3, $p = 5,9 \cdot 10^{-9}$). Insgesamt zeigten in

Makrophagen der gesunden Probanden 460 Gene eine signifikante Hochregulation, 397 Gene eine signifikante Herunterregulation. Bei den HI-Patienten waren 435 Gene signifikant hoch- und 337 Gene signifikant herunterreguliert (Abbildung 16).

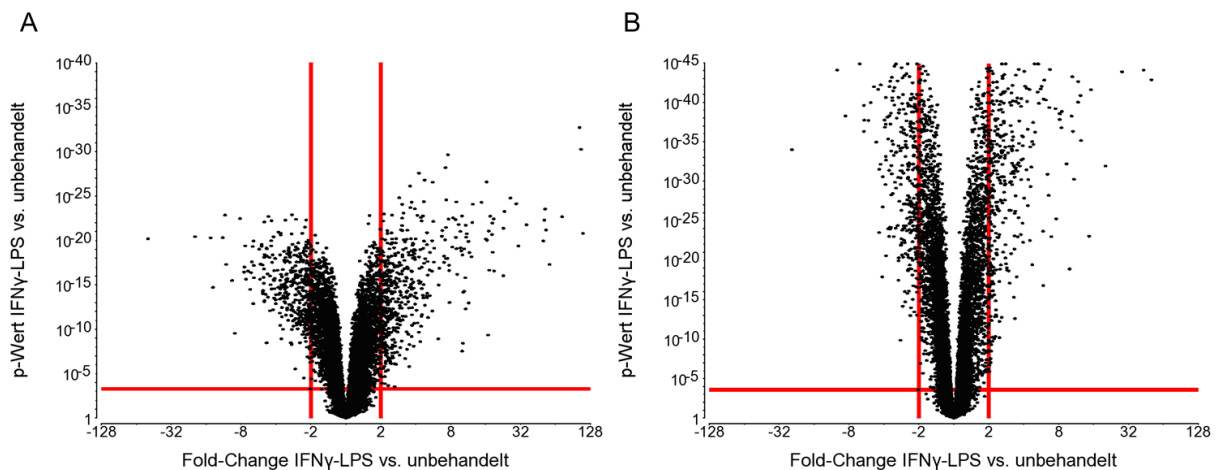


Abbildung 16: Effekt der IFN γ -LPS Stimulierung auf die Genexpression in Makrophagen.

Die x-fache Genexpressionsänderung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen (x-Achse; N/C=no change) ist gegen den zugehörigen p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Gen/*Transcript Cluster*. Die roten Linien markieren die Signifikanzbereiche $FC < -2$ bzw. $FC > 2$ und mit einer FDR von 0,05 korrigierte p-Werte. A zeigt die Werte der Zellen gesunder Probanden (behandelt $n=28$, unbehandelt $n=28$; Cutoff $p < 6 \cdot 10^{-4}$), B die der Zellen von HI-Patienten (behandelt $n=40$, unbehandelt $n=40$; Cutoff $p < 3 \cdot 10^{-4}$).

Der Vergleich der Genexpression der stimulierten Makrophagen ergab keine signifikanten Unterschiede basierend auf dem 9p21.3 Haplotyp (Abbildung 17) trotz der weniger stringenten Korrektur der p-Werte mit einer FDR von 0,2.

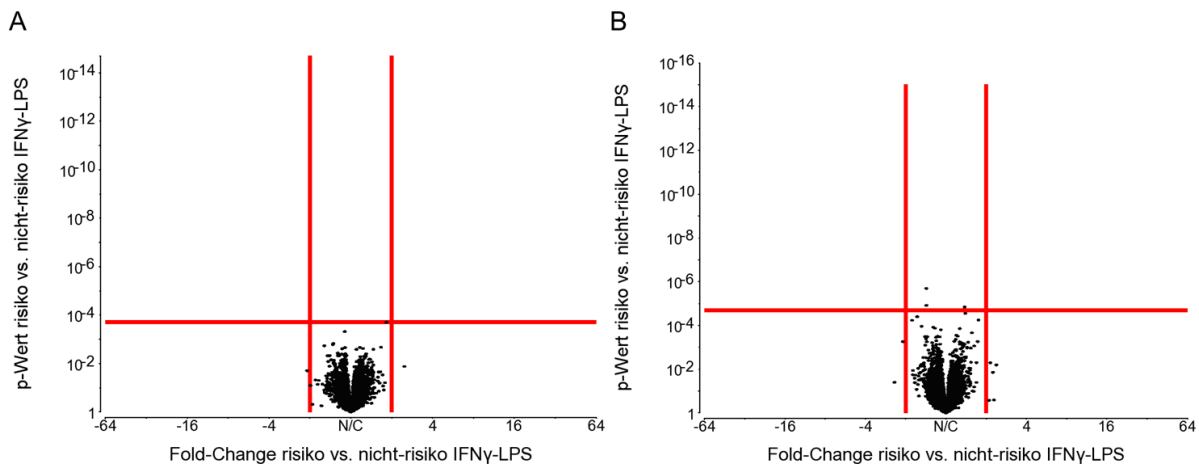


Abbildung 17: Unterschiede des Effekts der IFN γ -LPS Stimulierung zwischen den beiden Haplotyp-Gruppen.

Die x-fache Genexpressionsänderung zwischen risiko und nicht-risiko Zellen (x-Achse; N/C=no change) ist gegen den zugehörigen p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Gen/*Transcript Cluster*. Die roten Linien markieren die Signifikanzbereiche $FC < -2$ bzw. $FC > 2$ und mit einer FDR von 0,2 korrigierte p-Werte. A zeigt die Werte der Zellen gesunder Probanden (risiko $n=14$, nicht-risiko $n=14$; Cutoff $p < 2 \cdot 10^{-4}$), B die der Zellen von HI-Patienten (risiko $n=20$, nicht-risiko $n=20$; Cutoff $p < 2 \cdot 10^{-5}$).

3.5 Unterschiedliche Reaktion der Makrophagen auf atherogene Stimulierung aufgrund des 9p21.3 Haplotyps

Um zu untersuchen, ob die Makrophagen basierend auf dem 9p21.3 Haplotyp unterschiedlich auf die atherogenen Stimulierungen reagieren, wurden die Expressionsunterschiede zwischen Personen mit risiko und nicht-risiko Haplotyp verglichen (FC Verhältnis risiko/nicht-risiko). Indem man diese beiden Werte der Expressionsänderungen ins Verhältnis zueinander setzt, erhält man ein Maß für stärkere ($\geq 1,25$) oder geringere ($\leq 0,75$) Hoch- oder Herunterregulation in der Risiko-Gruppe im Vergleich zur nicht-risiko Gruppe. Für diesen Vergleich wurden alle Gene herangezogen, welche die Signifikanz-Kriterien für differenzielle Expression durch die Stimulierung ($FC < -2$ bzw. $FC > 2$ und FDR 0,05) sowohl in risiko als auch in nicht-risiko erfüllten.

3.5.1 Mit 9cRA-T0901317 behandelte Makrophagen

Durch die Behandlung der Makrophagen von Herzinfarkt-Patienten mit 9cRA und T0901317 wurden in den Zellen 183 Gene in beiden Haplotyp-Gruppen signifikant hochreguliert, während 219 Gene herunterreguliert waren. Die meisten Gene wiesen keine Unterschiede in

der Genregulation aufgrund des 9p21.3 Haplotyps auf ($0,75 > \text{FC Verhältnis} < 1,25$). Dennoch zeigten 17,7 % der Gene eine stärkere Antwort auf die Stimulation in Trägern des Risiko-Allels (FC Verhältnis $\geq 1,25$), wobei der größere Anteil dieser Gene durch die Behandlung der Zellen herunterreguliert war. Dagegen war bei nur 0,7 % der Gene eine geringere Expressionsänderung in der Risiko-Gruppe zu beobachten (Abbildung 18, Tabelle 8).

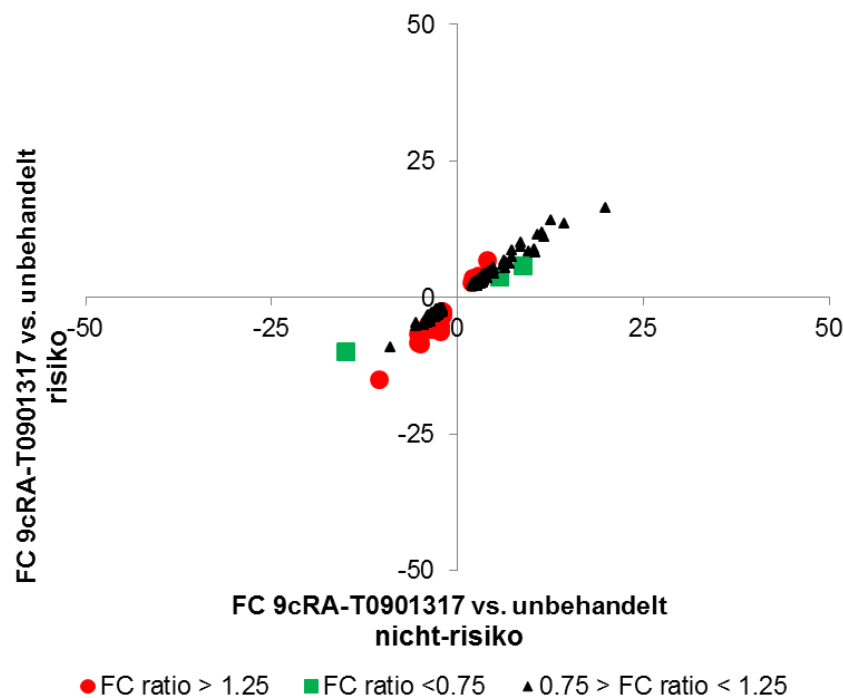


Abbildung 18: Haplotyp-spezifische Unterschiede in der Expressionsänderung in Makrophagen von HI-Patienten durch 9cRA-T0901317.

Auf der x-Achse sind die mittleren x-fachen Änderungen für die 9p21.3 nicht-risiko Gruppe aufgetragen, auf der y-Achse die *Fold Changes* der Risiko Gruppe. Gene mit Hoch- oder Herunterregulation von mehr als 25 % in risiko sind in rot dargestellt, Gene mit geringerer Regulation von mehr als 25 % im Vergleich zu nicht-risiko in grün.

Tabelle 8: Unterschiede in der Genexpressionsänderung zwischen risiko und nicht-risiko Haplotypen in mit 9cRA-T0901317 behandelten Makrophagen aus HI-Patienten

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | FC risiko Haplotyp | FC nicht-risiko Haplotyp | FC ratio risiko/nicht-risiko |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>hochregulierte Gene</i> | | | | |
| SLC40A1 | 2591837 | 3,47 | 2,09 | 1,66 |
| CLGN | 2787005 | 6,72 | 4,07 | 1,65 |
| DDIT4 | 3251393 | 3,52 | 2,50 | 1,41 |
| SORL1 | 3352948 | 2,99 | 2,16 | 1,38 |
| S1PR1 | 2349129 | 2,67 | 2,00 | 1,34 |
| PSAT1 | 3175971 | 3,82 | 2,90 | 1,32 |
| SATB1 | 2665199 | 2,72 | 2,16 | 1,26 |
| ZNF436 | 2401333 | 2,65 | 2,12 | 1,25 |
| ARRDC3 | 2866704 | 2,75 | 2,21 | 1,25 |
| CD300LB | 3770290 | 3,74 | 5,64 | 0,66 |
| EMR3 | 3852832 | 5,66 | 8,91 | 0,64 |
| <i>herunterregulierte Gene</i> | | | | |
| TUBA1B | 3453732 | -6,35 | -2,22 | 2,86 |
| FABP4 | 3142381 | -5,28 | -2,25 | 2,34 |
| RRM2 | 2469252 | -5,93 | -3,26 | 1,82 |
| KIAA0101 | 3629103 | -4,30 | -2,45 | 1,76 |
| IL1RN | 2501204 | -8,63 | -4,99 | 1,73 |
| CCL8 | 3718191 | -4,63 | -2,69 | 1,72 |
| RGS1 | 2372781 | -3,63 | -2,11 | 1,72 |
| CCNE2 | 3145107 | -4,91 | -2,90 | 1,69 |
| C13orf15 | 3486956 | -8,27 | -5,23 | 1,58 |
| SC4MOL | 2750594 | -3,15 | -2,02 | 1,56 |
| CCL22 | 3662687 | -5,00 | -3,27 | 1,53 |
| AGPAT9 | 2734047 | -4,18 | -2,73 | 1,53 |
| CDK1 | 3248289 | -3,05 | -2,00 | 1,52 |
| FAM111B | 3331903 | -4,20 | -2,84 | 1,48 |
| TIMP3 | 3943504 | -3,21 | -2,18 | 1,47 |
| EGR2 | 3291601 | -3,17 | -2,17 | 1,46 |
| CDC6 | 3720896 | -4,19 | -2,88 | 1,46 |
| SHCBP1 | 3689880 | -3,82 | -2,63 | 1,45 |
| CLEC5A | 3076868 | -15,16 | -10,48 | 1,45 |
| MELK | 3168508 | -3,80 | -2,63 | 1,44 |
| IL2RG | 4011844 | -3,05 | -2,14 | 1,43 |
| ALCAM | 2634494 | -3,84 | -2,71 | 1,42 |
| NCAPH | 2494484 | -7,17 | -5,09 | 1,41 |
| EMP1 | 3405748 | -6,38 | -4,54 | 1,41 |
| DTL | 2378937 | -4,10 | -2,92 | 1,40 |
| TPX2 | 3881443 | -2,85 | -2,04 | 1,39 |

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | FC risiko Haplotyp | FC nicht-risiko Haplotyp | FC ratio risiko/nicht-risiko |
|--|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>herunterregulierte Gene (Fortsetzung)</i> | | | | |
| GPC4 | 4022370 | -3,59 | -2,60 | 1,38 |
| FLRT2 | 3546924 | -2,78 | -2,02 | 1,38 |
| MREG | 2598496 | -3,06 | -2,22 | 1,38 |
| CA2 | 3105600 | -5,19 | -3,81 | 1,36 |
| TYMS | 3775842 | -2,87 | -2,12 | 1,35 |
| MMP19 | 3457275 | -3,83 | -2,87 | 1,34 |
| FGD4 | 3410614 | -3,04 | -2,28 | 1,33 |
| RNF128 | 3986261 | -4,55 | -3,43 | 1,32 |
| SPP1 | 2735027 | -3,78 | -2,86 | 1,32 |
| GEM | 3144934 | -5,33 | -4,05 | 1,32 |
| SPC25 | 2585933 | -3,24 | -2,46 | 1,32 |
| TUBB2C | 4050485 | -2,64 | -2,01 | 1,31 |
| NCAPG | 2720251 | -2,71 | -2,08 | 1,30 |
| PRC1 | 3639031 | -2,71 | -2,08 | 1,30 |
| SGPP2 | 2529421 | -2,84 | -2,19 | 1,29 |
| AGAP11 | 3256221 | -4,63 | -3,58 | 1,29 |
| HIST1H3C | 2899102 | -3,39 | -2,64 | 1,28 |
| ATF3 | 2379132 | -4,53 | -3,53 | 1,28 |
| MKI67 | 3312490 | -3,07 | -2,39 | 1,28 |
| MYO1E | 3626826 | -3,38 | -2,64 | 1,28 |
| ATP1B1 | 2366422 | -3,98 | -3,11 | 1,28 |
| NRIP3 | 3362159 | -2,61 | -2,05 | 1,28 |
| GLIPR2 | 3168385 | -3,42 | -2,68 | 1,28 |
| GREM1 | 3587553 | -6,67 | -5,24 | 1,27 |
| PNP | 3527514 | -3,76 | -2,97 | 1,27 |
| GINS1 | 3880827 | -3,89 | -3,08 | 1,26 |
| SLC1A3 | 2806643 | -4,67 | -3,71 | 1,26 |
| CEP55 | 3258444 | -2,82 | -2,24 | 1,26 |
| FABP3 | 2404418 | -3,01 | -2,39 | 1,26 |
| TUBA1C | 3413787 | -2,60 | -2,07 | 1,26 |
| CENPI | 3984655 | -2,96 | -2,36 | 1,25 |
| TOB1 | 3762473 | -2,72 | -2,18 | 1,25 |
| F3 | 2423907 | -3,05 | -2,44 | 1,25 |
| EXO1 | 2388219 | -2,82 | -2,26 | 1,25 |
| TUBB6 | 3779579 | -2,59 | -2,08 | 1,25 |
| HELLS | 3258910 | -2,97 | -2,39 | 1,25 |
| F13A1 | 2940202 | -9,98 | -15,04 | 0,66 |

Sowohl bei den hoch- als auch herunterregulierten Genen zeigten fast überwiegend die Träger des Risiko-Haplotyps eine stärkere Antwort auf die Stimulierung ($FC\ ratio \geq 1,25$). Um die große Gruppe der 62 Gene zu charakterisieren, die durch die Stimulierung mit 9cRA-T0901317 in der Risiko-Gruppe stärker herunterreguliert wurden als in Trägern des nicht-risiko Haplotyps, wurde mit diesen Genen eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse hinsichtlich biologischer Prozesse durchgeführt (GO_BP_2) (siehe 2.7.2). In Tabelle 9 sind die gehäuft in der Ergebnisliste vertretenen biologischen Prozesse dargestellt.

Tabelle 9: Signifikant angereicherte biologische Prozesse (GO-Analyse) aus Tabelle 8

| GO-Kategorie | Anzahl | % | Gene | F.E. | p-Wert |
|---|--------|-----|--|------|--------|
| GO:0051301 cell division | 9 | 15 | <i>CCNE2, SPC25, CDK1, CDC6, NCAPH, PRC1, NCAPG, CEP55, HELLS</i> | 7,4 | 0,000 |
| GO:0007049 cell cycle | 13 | 21 | <i>EXO1, CDK1, CDC6, PRC1, MKI67, C13ORF15, TPX2, CEP55, CCNE2, SPC25, NCAPH, NCAPG, HELLS</i> | 4,1 | 0,000 |
| GO:0022402 cell cycle process | 11 | 18 | <i>EXO1, SPC25, CDK1, CDC6, NCAPH, MKI67, PRC1, NCAPG, TPX2, CEP55, HELLS</i> | 4,8 | 0,000 |
| GO:0006955 immune response | 10 | 16 | <i>EXO1, CCL22, RGS1, TUBB2C, IL1RN, CCL8, IL2RG, GEM, CLEC5A, PNP</i> | 3,6 | 0,000 |
| GO:0007017 microtubule-based process | 6 | 9,7 | <i>SPC25, PRC1, TUBB2C, TUBB6, TUBA1B, TUBA1C</i> | 5,8 | 0,001 |
| GO:0006950 response to stress | 16 | 26 | <i>EXO1, CDK1, ATP1B1, DTL, TUBB2C, IL1RN, CCL8, TIMP3, TYMS, CCL22, SLC1A3, F3, CA2, CLEC5A, FGD4, SPP1</i> | 2,3 | 0,001 |
| GO:0009719 response to endogenous stimulus | 7 | 11 | <i>EGR2, IL1RN, FABP3, FABP4, CA2, TIMP3, SPP1</i> | 4,3 | 0,001 |
| GO:0006323 DNA packaging | 4 | 6,5 | <i>NCAPH, NCAPG, HIST1H3C, HELLS</i> | 8,7 | 0,001 |
| GO:0042221 response to chemical stimulus | 13 | 21 | <i>ATP1B1, EGR2, IL1RN, CCL8, PNP, TIMP3, TYMS, CCL22, SLC1A3, FABP3, FABP4, CA2, SPP1</i> | 2,5 | 0,002 |
| GO:0034621 cellular macromolecular complex subunit organization | 6 | 9,7 | <i>TUBB2C, TUBB6, HIST1H3C, TUBA1B, TUBA1C, HELLS</i> | 4,1 | 0,003 |
| GO:0007059 chromosome segregation | 3 | 4,8 | <i>SPC25, NCAPH, NCAPG</i> | 9 | 0,004 |
| GO:0048589 developmental growth | 3 | 4,8 | <i>GINS1, MREG, TIMP3</i> | 8,5 | 0,005 |
| GO:0050793 regulation of developmental process | 8 | 13 | <i>EGR2, F3, IL2RG, CA2, PNP, TOB1, SPP1, FGD4</i> | 2,9 | 0,006 |
| GO:0006996 organelle organization | 12 | 19 | <i>SPC25, CDK1, CDC6, NCAPH, PRC1, NCAPG, TPX2, HIST1H3C, CEP55, TUBA1B, HELLS, FGD4</i> | 2,2 | 0,007 |
| GO:0008283 cell proliferation | 6 | 9,7 | <i>GINS1, GPC4, MKI67, TPX2, EMP1, HELLS</i> | 3,4 | 0,008 |

F.E., *Fold Enrichment*

fettgedruckt = Zusammenhang mit Zellzyklus und Zellteilung

Neben der GO-ID und Bezeichnung der Kategorie sind Anzahl und Prozentsatz angegeben, den die aufgeführten Gene darstellen. Auskunft über die Anreicherung gibt der Wert *Fold Enrichment* (F.E.), welcher über den p-Wert auf seine Signifikanz hin beurteilt wird. Es ergaben sich insbesondere signifikant angereicherte Prozesse, die im Zusammenhang mit Zellzyklus und Zellteilung stehen. Es wurden vor allem Gene aus diesen biologischen *Pathways* durch Stimulierung der Makrophagen mit 9cRA-T0901317 aufgrund des 9p21.3 Risiko-Haplotyps stärker herunterreguliert im Vergleich zur Referenzgruppe.

3.5.2 Mit IFN γ -LPS behandelte Makrophagen

Bei den gesunden Probanden waren durch die Stimulierung der Makrophagen mit IFN γ -LPS 419 Gene in beiden Haplotyp-Gruppen signifikant hochreguliert, 326 Gene waren herunterreguliert. Bei HI-Patienten konnten insgesamt stärkere Änderungen beobachtet werden und es ergaben sich 403 hoch- und 267 herunterregulierte Gene, die beide Haplotyp-Gruppen gemeinsam hatten. Auch hier wiesen die meisten Gene keine Unterschiede in der Genregulation aufgrund des 9p21.3 Haplotyps auf ($0,75 > \text{FC Verhältnis} < 1,25$). Dennoch zeigten bei gesunden Probanden 1,1 % und bei HI-Patienten 11,3 % der Gene eine stärkere Antwort auf die Stimulation in Trägern des Risiko-Allels. Geringere Expressionsänderungen in der Risiko-Gruppe waren bei Gesunden in 6,6 % und bei HI-Patienten in 4,6 % der Gene zu beobachten (Abbildung 19, Tabelle 18 im Anhang).

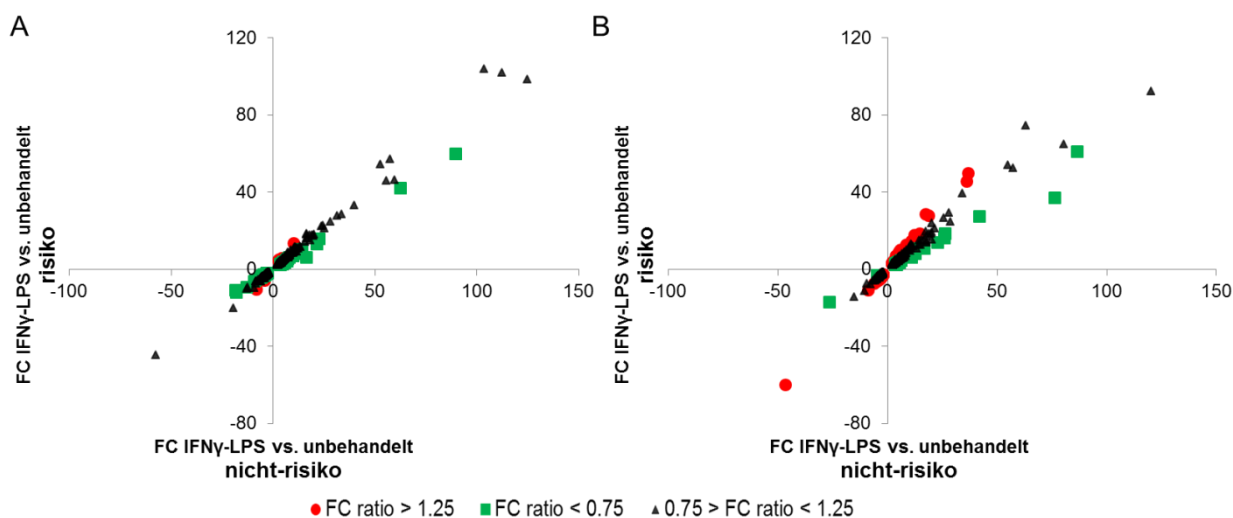


Abbildung 19: Haplotyp-spezifische Unterschiede in der Expressionsänderung in Makrophagen durch IFN γ -LPS.

Auf der x-Achse sind die mittleren x-fachen Änderungen für die 9p21.3 nicht-risiko Gruppe aufgetragen, auf der y-Achse die *Fold Changes* der Risiko Gruppe. Gene mit Hoch- oder Herunterregulierung von mehr als 25 % in risiko sind in Rot dargestellt, Gene mit schwächerer Regulierung von mehr als 25 % im Vergleich zu nicht-risiko in Grün. Bild A zeigt die Werte der gesunden Probanden, Bild B die der HI-Patienten.

Aufgrund der großen Anzahl an Kandidatengenen und den teils auch gegensätzlichen Effekten in den gesunden Probanden und HI-Patienten wurde der Fokus auf die Gene gelegt, die in beiden Kohorten einheitlich Unterschiede in der Reaktion auf die Stimulierung basierend auf dem 9p21.3 Haplotyp zeigten. So ergaben sich 12 Gene, die sowohl in gesunden Probanden als auch in HI-Patienten $\geq 25\%$ Unterschied in der Expressionsänderung in mindestens einer Kohorte und zusätzlich $\geq 10\%$ in der anderen Kohorte zeigten (Tabelle 10).

Tabelle 10: Unterschiede in der Expressionsänderung zwischen risiko und nicht-risiko Haplotyp-Gruppen in mit IFN γ -LPS behandelten Makrophagen

| Gen-Symbol | Transcript cluster ID | Gesunde Probanden | | | HI-Patienten | | |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | FC risiko Haplotyp | FC nicht-risiko Haplotyp | FC ratio risiko/nicht-risiko | FC risiko Haplotyp | FC nicht-risiko Haplotyp | FC ratio risiko/nicht-risiko |
| hochregulierte Gene | | | | | | | |
| IL1B | 2571510 | 27,46 | 31,58 | 0,87 | 61,23 | 86,60 | 0,71 |
| IL12B | 2884301 | 4,50 | 3,28 | 1,37 | 12,30 | 9,25 | 1,33 |
| CASP5 | 3389330 | 2,42 | 3,53 | 0,69 | 6,60 | 8,24 | 0,80 |
| CCL8 | 3718191 | 17,37 | 19,56 | 0,89 | 37,06 | 76,24 | 0,49 |
| ENPP2 | 3150579 | 3,48 | 5,78 | 0,60 | 6,25 | 10,95 | 0,57 |
| MT1A | 3662106 | 5,37 | 7,40 | 0,73 | 11,00 | 16,64 | 0,66 |
| MT1E | 3662158 | 8,14 | 13,04 | 0,62 | 18,53 | 26,44 | 0,70 |
| MUCL1 | 3416702 | 2,58 | 4,78 | 0,54 | 5,51 | 6,74 | 0,82 |
| NDP | 4006280 | 8,46 | 11,60 | 0,73 | 7,60 | 10,48 | 0,72 |
| TNIP3 | 2783916 | 9,32 | 11,00 | 0,85 | 16,24 | 25,93 | 0,63 |
| VCAN | 2818517 | 1,37 | 1,67 | 0,82 | 3,33 | 5,29 | 0,63 |
| herunterreguliertes Gen | | | | | | | |
| CD163 | 3442706 | -4,99 | -4,05 | 1,23 | -3,22 | -1,67 | 1,93 |

Auffällig war, dass in dieser kleinen Gruppe von Genen zwei Metallothionine (MTs) auftraten ($p < 0,001$). Deshalb wurden die Expressionsunterschiede aller Mitglieder dieser Genfamilie betrachtet, die auf dem Array abgebildet waren (Tabelle 11). Alle MT Gene wiesen höhere Expression auf, wenn die Zellen mit IFN γ -LPS behandelt worden waren, außer *MT1B* in Makrophagen der gesunden Probanden, dessen Expression unverändert blieb. Bezüglich der Unterschiede in der Reaktion auf die Stimulierung zeigten die meisten MTs eine weniger starke Hochregulation in Trägern des Risiko-Allels im Vergleich zur nicht-risiko Gruppe, nur wenige wiesen keinen Unterschied auf.

Außerdem waren unter den Genen mit unterschiedlicher Reaktion auf die Stimulierung auch zwei Vertreter der Interleukin-Genfamilie (*IL12B* und *IL1B*, siehe Tabelle 10) ($p < 0,001$). Insgesamt wurden nur 7 der 42 auf dem Array abgebildeten Interleukine durch die Stimulierung der Makrophagen mit IFN γ -LPS signifikant mit einem FC > 2 induziert. Davon zeigten noch *IL8* und *IL18* hinsichtlich des FC Verhältnisses, allerdings nur in HI-Patienten, auffällige Unterschiede (FC ratio 0,66 bzw. 0,78), *IL6*, *IL1A* und *IL32* waren sowohl in Gesunden als auch in HI-Patienten in beiden Haplotyp-Gruppen gleich stark hochreguliert.

Tabelle 11: Expressionsunterschiede in der Metallothionin (MT)-Genfamilie zwischen risiko und nicht-risiko Haplotypen in mit IFN γ und LPS behandelten Makrophagen

| Gen-Symbol | Transcript cluster ID | Gesunde Probanden | | | HI-Patienten | | |
|--------------|-----------------------|---|---|------------------------------|---|---|------------------------------|
| | | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt risiko | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt nicht-risiko | FC ratio risiko/nicht-risiko | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt risiko | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt nicht-risiko | FC ratio risiko/nicht-risiko |
| <i>MT1A</i> | 3662106 | 5,37 | 7,40 | 0,73 | 11,00 | 16,64 | 0,66 |
| <i>MT1B</i> | 3662190 | -1,01 | -1,06 | 0,95 | 2,00 | 2,13 | 0,94 |
| <i>MT1E</i> | 3662158 | 8,14 | 13,04 | 0,62 | 18,53 | 26,44 | 0,70 |
| <i>MT1G</i> | 3692999 | 9,54 | 8,74 | 1,09 | 8,16 | 12,70 | 0,64 |
| <i>MT1H</i> | 3662201 | 10,96 | 11,83 | 0,93 | 10,61 | 13,30 | 0,80 |
| <i>MT1IP</i> | 3662236 | 1,15 | 1,32 | 0,87 | 1,98 | 2,26 | 0,88 |
| <i>MT1L</i> | 3662130 | 6,28 | 16,59 | 0,38 | 19,22 | 17,34 | 1,12 |
| <i>MT1M</i> | 3662150 | 42,26 | 62,61 | 0,68 | 52,15 | 57,34 | 0,91 |
| <i>MT1X</i> | 3662247 | 4,39 | 7,05 | 0,62 | 5,34 | 5,81 | 0,92 |
| <i>MT3</i> | 3662093 | 1,29 | 1,42 | 0,91 | 1,39 | 1,24 | 1,12 |
| <i>MT4</i> | 3662086 | 2,15 | 2,60 | 0,83 | 2,23 | 2,24 | 1,00 |

3.6 Validierung ausgewählter Gene

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Genexpressionsprofils zu bestätigen, wurden Gene für Validierung mittels qPCR ausgewählt (siehe 2.8). Die Auswahl erfolgte anhand der höchsten Haplotyp-spezifischen Unterschiede bei IFN γ -LPS Stimulierung, die außerdem einheitlich bei Gesunden und HI-Patienten auftraten. In der Gruppe der Metallothionine wurden *MT1A*, *MT2A* (Sonden auf dem Array waren im *Transcript Cluster* von *MT1A* enthalten), *MT1E*, *MT1G*, *MT1H*, *MT1L* und *MT1M* ausgewählt, da diese Gene innerhalb einer Haplotyp-Gruppe einen FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt von mindestens 5-fach zeigten.

Die wesentlichen Ergebnisse konnten reproduziert werden, wie in Tabelle 12 gezeigt ist. *IL1B* zeigte ähnliche Unterschiede in HI-Patienten (49 % weniger hochreguliert in risiko), jedoch keinen Unterschied in Gesunden. Für *IL12B* wurde absolute Quantifizierung verwendet, da dieses Gen in unbehandelten Makrophagen extrem niedrig exprimiert war und daher teilweise nicht detektiert werden konnte, was ein Problem für die relative Quantifizierung darstellt. Der Vergleich der stimulierten Zellen mit den unbehandelten Kontrollen zeigte wieder stärkere Hochregulation von *IL12B* in der Risiko-Gruppe (Gesunde 54 %, HI-Patienten 81 %). Auch wenn keiner dieser Vergleiche statistisch signifikant war, ist

eine starke Tendenz zu sehen, dass *IL1B* weniger hochreguliert und *IL12B* stärker hochreguliert ist in Trägern des 9p21.3 Risiko-Haplotyps.

Die Genexpressionsassays, die für die Metallothionine zur Verfügung standen, waren meistens auch in der Lage, genomische DNA zu detektieren. Unter Anwendung geeigneter Kontrollen konnte dies nur für drei der sieben untersuchten Gene ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz zeigte sich der gleiche Trend wie in den Arraydaten, wenn auch nicht statistisch signifikant.

Tabelle 12: qPCR Validierung ausgewählter Gene

| Gen-Symbol | Assay ID | Gesunde Probanden | | | | HI-Patienten | | | |
|--------------|---------------|---|---|--|--|---|---|--|--|
| | | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt risiko | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt nicht-risiko | FC <i>ratio</i> risiko/nicht- risiko | p-Wert t-Test $\Delta\Delta C_q$ Werte | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt risiko | FC IFN γ -LPS vs. unbehandelt nicht-risiko | FC <i>ratio</i> risiko/nicht- risiko | p-Wert t-Test $\Delta\Delta C_q$ Werte |
| <i>CD163</i> | Hs00174705_m1 | -12,50 | -8,33 | 1,50 | 0,285 | -3,70 | -1,96 | 1,89 | 0,115 |
| <i>CASP5</i> | Hs00362078_m1 | 7,82 | 11,02 | 0,71 | 0,306 | 34,68 | 46,54 | 0,75 | 0,406 |
| <i>ENPP2</i> | Hs00196470_m1 | 5,42 | 10,24 | 0,53 | 0,059 | 14,82 | 29,27 | 0,51 | 0,146 |
| <i>IL1B</i> | Hs00174097_m1 | 139,45 | 131,65 | 1,06 | 0,851 | 452,61 | 891,70 | 0,51 | 0,093 |
| <i>NDP</i> | Hs00181129_m1 | 125,67 | 174,62 | 0,72 | 0,630 | 140,70 | 213,81 | 0,66 | 0,397 |
| <i>MT1G</i> | Hs01584215_g1 | 42,49 | 62,11 | 0,68 | 0,192 | 50,22 | 90,93 | 0,55 | 0,193 |
| <i>MT1L</i> | Hs01591331_g1 | 75,81 | 98,18 | 0,77 | 0,520 | 73,72 | 113,10 | 0,65 | 0,425 |
| <i>MT1M</i> | Hs00828387_g1 | 97,39 | 137,20 | 0,71 | 0,224 | 134,58 | 243,53 | 0,55 | 0,253 |
| | | Mittlere Differenz Molekülanzahl IFN γ -LPS – unbehandelt risiko | Mittlere Differenz Molekülanzahl IFN γ -LPS – unbehandelt nicht-risiko | Ratio risiko/nicht- risiko | p-Wert t-Test Differenz Molekülanzahl | Mittlere Differenz Molekülanzahl IFN γ -LPS – unbehandelt risiko | Mittlere Differenz Molekülanzahl IFN γ -LPS – unbehandelt nicht-risiko | Ratio risiko/nicht- risiko | p-Wert t-Test Differenz Molekülanzahl |
| <i>IL12B</i> | Hs01011518_m1 | 2260 | 1464 | 1,54 | 0,241 | 11547 | 6316 | 1,83 | 0,598 |

3.7 Alternatives Spleißen

Die gute Abdeckung des Exon Arrays mit Sonden verteilt über die meisten Exons eines jeden Gens erlaubt die Analyse von möglichem alternativen Spleißen (siehe 2.7.2). Hierbei wird ermittelt, ob ein Exon oder einzelne Exons Expressionsunterschiede zwischen Gruppen zeigen, während die anderen gleich stark exprimiert sind. Wie schon bei der globalen Genexpression wurden der Einfluss von IFN γ -LPS und von 9cRA-T0901317 im Allgemeinen sowie Unterschiede zwischen den 9p21.3 Haplotyp-Gruppen untersucht. Durch die *alternative splicing* ANOVA wurden Gene anhand eines niedrigen p-Werts für alternatives Spleißen als mögliche Kandidaten identifiziert und anschließend mit Hilfe des *Gene Views* in der Partek Genomics Suite 6.5 Software betrachtet. In Abbildung 20 ist diese Ansicht beispielhaft für die *Probesets* des Gens *TNF* mit den zugehörigen log2 Expressionswerten der Makrophagen aus HI-Patienten dargestellt ($p < 10^{-50}$ für „Behandlung“ als alternativen Spleißfaktor).

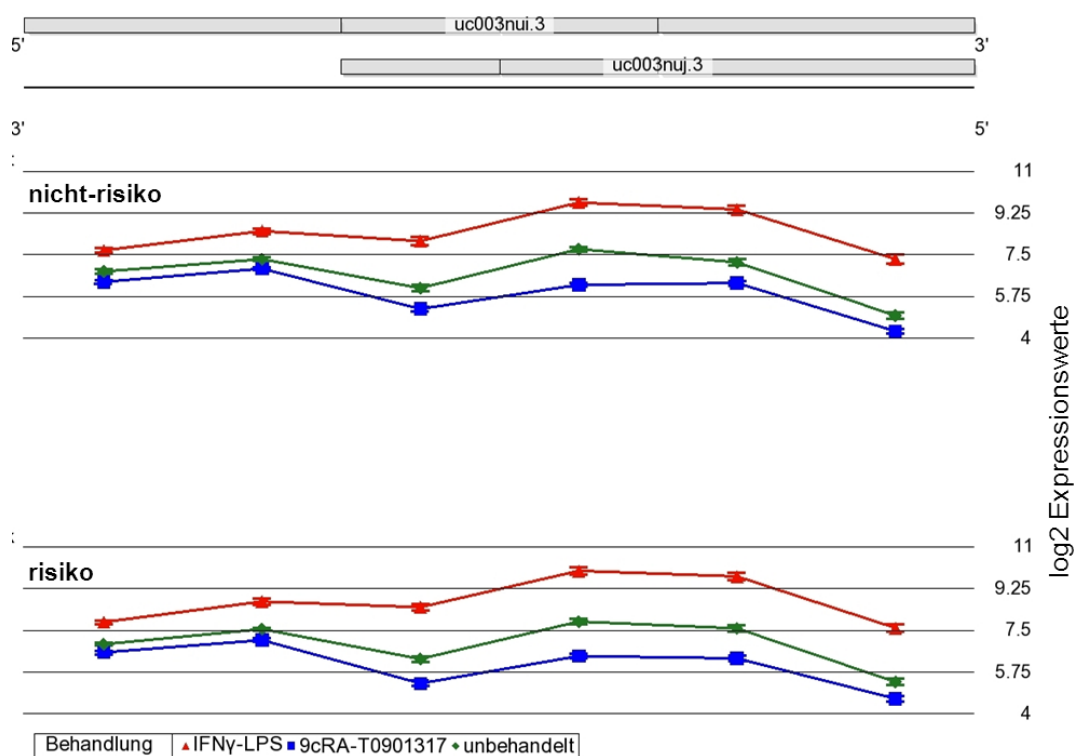


Abbildung 20: *Gene View* für das Gen *TNF* (HI-Patienten).

Die mittleren log2 Expressionswerte mit Standardabweichung (y-Achse) sind für jedes einzelne *Probeset* (abgebildet durch die Symbole, x-Achse) für beide 9p21.3 Haplotyp-Gruppen aufgetrennt nach den verschiedenen Behandlungen dargestellt. Oberhalb der Expressionsprofile befinden sich die bekannten Isoformen des Gens.

Im oberen Bereich der Grafik sind die bekannten Isoformen des Gens abgebildet, so dass eine Zuordnung der *Probesets* zu den jeweiligen Exons leicht möglich ist und schnell abgeschätzt werden kann, ob ein alternatives Spleißereignis vorliegen könnte. Es war zu erkennen, dass die *Probesets*, welche die kurze Isoform von *TNF* detektieren, größere Expressionsunterschiede durch die Stimulierungen zeigten als die beiden *Probesets*, die nur die lange Variante detektieren. Einen genaueren Überblick über die Lage der *Probesets* gibt eine Darstellung mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* (Abbildung 21).

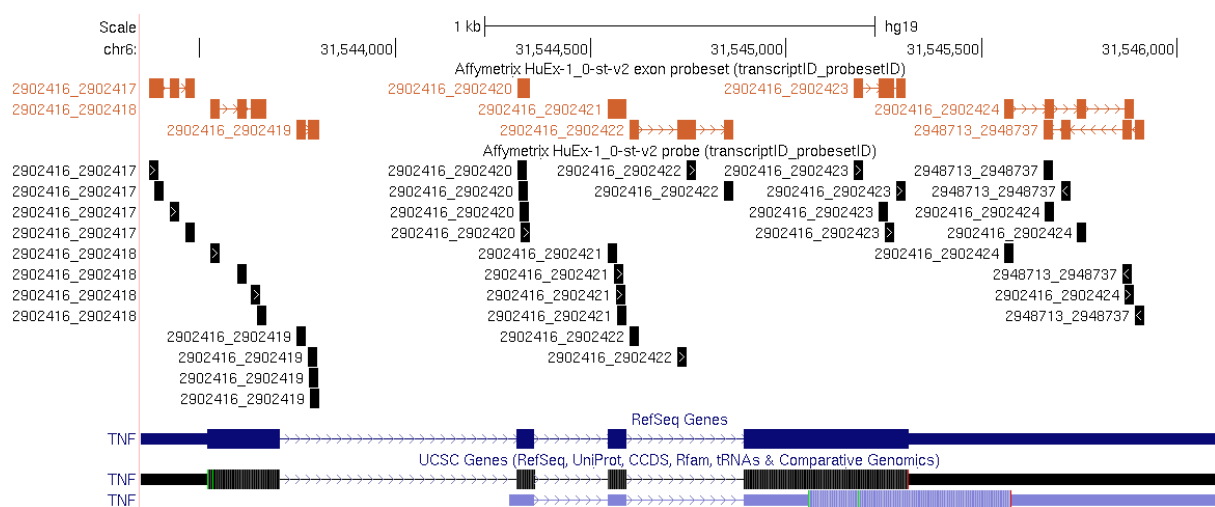


Abbildung 21: Das Gen *TNF* mit Affymetrix *Transcript Cluster* und *Probeset* IDs im *UCSC Genome Browser*.

Oberhalb der Isoformen sind die Einzelsonden mit ihrer *Probeset* ID (schwarz) und darüber die *Probesets* (orange) dargestellt, jeweils gekennzeichnet mit der ID des *Transcript Clusters*, zu dem sie gehören.

In dieser Darstellung ist gut zu sehen, dass jeweils ein *Probeset* ein Exon abbildet. Die beiden *Probesets* 2902419 und 2902422, die in einem Intron liegen, sind im *Gene View* nicht vorhanden, da sie nicht zum *core*, sondern zum *extended Megaprobeset* gehören. Aus den beiden Abbildung 20 und Abbildung 21 wird deutlich, dass durch die Stimulierung mit 9cRA-T0901317 die kurze Isoform von *TNF* herunterreguliert wird. Dagegen wird durch Behandlung mit IFN γ -LPS das Gen insgesamt hochreguliert, die kurze Variante jedoch stärker als die lange. Die Makrophagen gesunder Probanden wiesen ein sehr ähnliches Expressionsprofil auf. Unterschiede zwischen Trägern des Risiko-Haplotyps und Trägern des nicht-risiko Haplotyps waren in beiden Patientengruppen nicht zu beobachten (Abbildung 22).

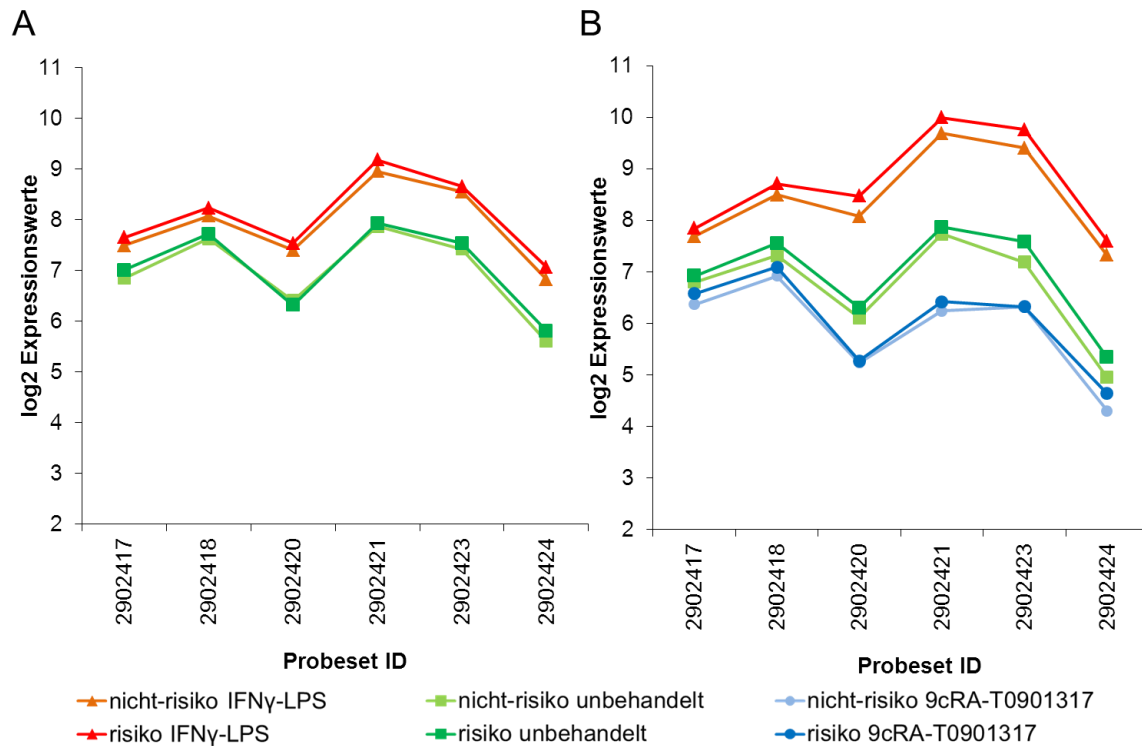


Abbildung 22: Expressionsprofile von *TNF*.

Für Makrophagen gesunder Probanden (A) und HI-Patienten (B) sind die Probesets des Gens *TNF* auf der x-Achse aufgetragen gegen die log2 Expressionswerte (y-Achse). Zwischen den Behandlungen sind Expressionsunterschiede zu sehen, nicht aber zwischen den risiko und nicht-risiko 9p21.3 Haplotyp-Gruppen.

Ein weiterer möglicher Kandidat für alternatives Spleißen war das Gen *LY75*, das aus deutlich mehr Exons besteht und in Abbildung 23 für die Daten der Makrophagen von HI-Patienten dargestellt ist ($p < 10^{-50}$ für „Behandlung“ als alternativen Spleißfaktor).

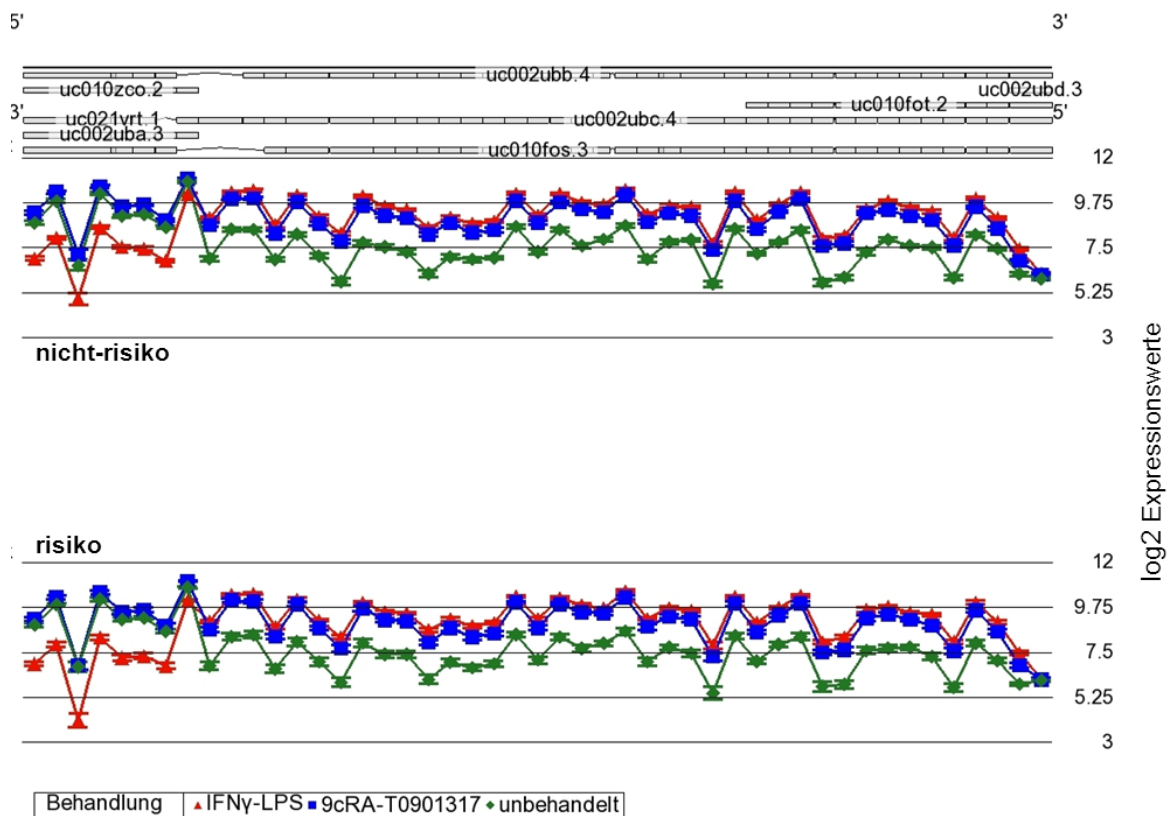


Abbildung 23: Gene View für das Gen LY75 (HI-Patienten).

Die mittleren log2 Expressionswerte mit Standardabweichung (y-Achse) sind für jedes einzelne Probeset (abgebildet durch die Symbole, x-Achse) für beide Haplotyp-Gruppen aufgetrennt nach den verschiedenen Behandlungen dargestellt. Oberhalb der Expressionsprofile befinden sich die bekannten Isoformen des Gens.

Auch für dieses Gen ergab sich ein sehr ähnliches Expressionsprofil in den Makrophagen gesunder Probanden und es lagen keine Unterschiede zwischen den 9p21.3 Haplotyp-Gruppen vor (nicht gezeigt). Aufgrund der komplexen Darstellung des längeren Gens aus mehreren Exons und dem Überlappen von mehreren *Transcript Clustern* wurde im *UCSC Genome Browser* auf eine Darstellung der Einzelsonden verzichtet und nur der interessante 3'-Bereich gezeigt (Abbildung 24). Es wird deutlich, dass einige *Probesets* des *Transcript Clusters* 2583254 (rot unterstrichen, nur *core Probesets*) neben LY75 auch das 3' angrenzende Gen CD302 detektieren.

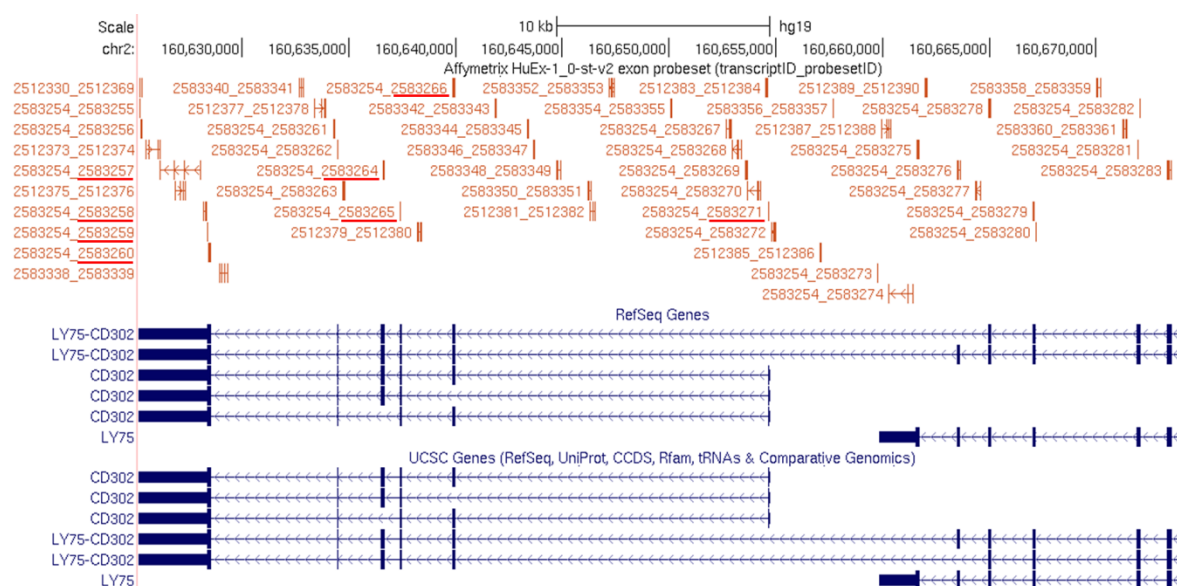


Abbildung 24: Ausschnitt des Detektionsbereichs des *Transcript Clusters* 2583254 im *UCSC Genome Browser*.

Oberhalb der Isoformen sind die *Probesets* (orange) gekennzeichnet mit der ID des *Transcript Clusters*, zu dem sie gehören, dargestellt. Rot unterstrichen sind die *core Probesets*, die *CD302* detektieren.

Aus den beiden Abbildung 23 und Abbildung 24 wird ersichtlich, dass in unbehandelten Zellen *CD302* auf höherem Level exprimiert war als *LY75*. Durch Behandlung mit IFN γ -LPS ergab sich eine Umkehr der Expressionslevel dieser beiden Gene. In mit 9cRA-T0901317 behandelten Zellen waren die Werte über den gesamten Detektionsbereich genauso hoch wie bei starker Expression der jeweiligen Abschnitte in unbehandelten oder mit IFN γ -LPS behandelten Zellen.

Insgesamt bedürfen diese Hinweise auf alternatives Spleißen ausführlicher Überprüfung und Validierung. Mögliche alternative Spleißereignisse, die die Existenz von noch unbekannten Isoformen vermuten lassen, wurden aufgrund der weiteren Komplexität bezüglich ihrer Validierung im Rahmen dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen.

3.8 Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3

In beiden Kohorten wurde die Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 in der Umgebung des Risiko-Locus untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen beschränkte sich dies auf *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDKN2BAS*, da erst eine kürzlich beschriebene Isoform von *MTAP* teilweise mit *CDKN2BAS* überlappt. Die Expression der Gene in Makrophagen wurde zum einen aus den Arraydaten extrahiert (Tabelle 13), wobei hier *MTAP* auch im Nachhinein einbezogen werden konnte und für *CDKN2BAS* das *extended Megaprobeset* (erweiterter Annotations-Informationsgehalt) herangezogen wurde, da dieses Gen in der *core* Annotation nicht abgebildet ist. Bei den gesunden Probanden wurden die Expressionsdaten der 9cRA-T0901317 Stimulierung nicht erhoben.

Tabelle 13: Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 (Array-Daten)

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | Gesunde Probanden | | | | HI-Patienten | | | |
|--|-----------------------|-------------------|-------------------------|-------|--------|-------------------|-------------------------|-------|--------|
| | | Mittelwert risiko | Mittelwert nicht-risiko | FC | p-Wert | Mittelwert risiko | Mittelwert nicht-risiko | FC | p-Wert |
| | | | | | | | | | |
| risiko vs. nicht-risiko | | | | | | | | | |
| Makrophagen - unbehandelt | | | | | | | | | |
| CDKN2A | 3201437 | 5,88 | 5,85 | 1,02 | 0,797 | 6,12 | 6,34 | -1,16 | 0,089 |
| CDKN2B | 3201488 | 7,36 | 7,39 | -1,02 | 0,740 | 7,73 | 7,71 | 1,01 | 0,761 |
| MTAP | 3164914 | 6,64 | 6,70 | -1,04 | 0,405 | 6,99 | 7,17 | -1,13 | 0,014 |
| CDKN2BAS | 3165013 | 3,00 | 2,94 | 1,05 | 0,364 | 3,20 | 3,13 | 1,04 | 0,493 |
| CDKN2BAS | 3165025 | 2,99 | 2,92 | -1,07 | 0,159 | 2,74 | 2,92 | 1,05 | 0,441 |
| Makrophagen – IFNγ-LPS stimuliert | | | | | | | | | |
| CDKN2A | 3201437 | 5,78 | 5,80 | -1,02 | 0,866 | 5,98 | 6,28 | -1,22 | 0,026 |
| CDKN2B | 3201488 | 7,11 | 7,05 | 1,04 | 0,428 | 7,27 | 7,31 | -1,02 | 0,607 |
| MTAP | 3164914 | 6,23 | 6,20 | 1,02 | 0,696 | 6,49 | 6,64 | -1,11 | 0,036 |
| CDKN2BAS | 3165013 | 3,00 | 3,05 | 1,04 | 0,481 | 3,26 | 3,18 | -1,03 | 0,580 |
| CDKN2BAS | 3165025 | 2,95 | 2,92 | 1,02 | 0,742 | 2,83 | 2,84 | 1,02 | 0,796 |
| Makrophagen – 9cRA-T0901317 stimuliert | | | | | | | | | |
| CDKN2A | 3201437 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 5,83 | 6,06 | -1,17 | 0,077 |
| CDKN2B | 3201488 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 7,60 | 7,71 | -1,08 | 0,102 |
| MTAP | 3164914 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 6,75 | 6,82 | -1,04 | 0,375 |
| CDKN2BAS | 3165013 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 3,18 | 3,26 | -1,06 | 0,385 |
| CDKN2BAS | 3165025 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2,93 | 2,78 | 1,11 | 0,094 |

Mittelwerte als log2 Intensitätswerte

n.d., *not determined*, wurde nicht gemessen

Zusätzlich wurde die Expression der Gene in Makrophagen und auch in Monozyten mittels qPCR untersucht (Tabelle 14).

Tabelle 14: Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 (qPCR-Daten)

| Gen-Symbol | Assay ID | Gesunde Probanden | | | | HI-Patienten | | | |
|--|---------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------|------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------|
| | | Mittelwert | Mittelwert | FC | p-Wert | Mittelwert | Mittelwert | FC | p-Wert |
| | | ΔC_p risiko | ΔC_p nicht- risiko | risiko vs. nicht-risiko | | ΔC_p risiko | ΔC_p nicht- risiko | risiko vs. nicht-risiko | |
| Makrophagen - unbehandelt | | | | | | | | | |
| CDKN2A | Hs00923894_m1 | 3,34 | 3,21 | 1,10 | 0,785 | 2,27 | 1,73 | 1,45 | 0,229 |
| CDKN2B | Hs00394703_m1 | 7,37 | 7,77 | 0,76 | 0,327 | 7,07 | 6,96 | 1,08 | 0,687 |
| CDKN2BAS | Hs01390879_m1 | 7,68 | 6,15 | 2,89 | <0,001 | 7,15 | 5,66 | 2,80 | <0,001 |
| CDKN2BAS | Hs01390880_m1 | 5,42 | 4,90 | 1,43 | 0,009 | 5,61 | 4,49 | 2,18 | <0,001 |
| Monozyten - unbehandelt | | | | | | | | | |
| CDKN2A | Hs00923894_m1 | 6,24 | 5,86 | 1,3 | 0,204 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CDKN2B | Hs00394703_m1 | 8,39 | 7,94 | 1,36 | 0,323 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CDKN2BAS | Hs01390879_m1 | 6,85 | 5,28 | 2,97 | <0,001 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CDKN2BAS | Hs01390880_m1 | 5,64 | 4,63 | 2,02 | <0,001 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Makrophagen – IFN γ -LPS Stimulierung | | | | | | | | | |
| CDKN2A | Hs00923894_m1 | 3,46 | 3,38 | 1,06 | 0,836 | 2,15 | 1,55 | 1,52 | 0,118 |
| CDKN2B | Hs00394703_m1 | 6,86 | 6,90 | 0,97 | 0,495 | 6,89 | 7,47 | 0,67 | 0,05 |
| CDKN2BAS | Hs01390879_m1 | 6,35 | 4,86 | 2,80 | <0,001 | 6,83 | 5,64 | 2,29 | <0,001 |
| CDKN2BAS | Hs01390880_m1 | 3,89 | 2,60 | 2,45 | <0,001 | 4,11 | 3,31 | 1,74 | <0,001 |
| Makrophagen – 9cRA-T0901317 Stimulierung | | | | | | | | | |
| CDKN2A | Hs00923894_m1 | 4,46 | 3,89 | 1,49 | 0,211 | 3,21 | 2,47 | 1,67 | 0,236 |
| CDKN2B | Hs00394703_m1 | 7,06 | 7,32 | 0,83 | 0,082 | 6,49 | 6,00 | 1,40 | 0,091 |
| CDKN2BAS | Hs01390879_m1 | 7,08 | 5,46 | 3,08 | <0,001 | 6,93 | 5,65 | 2,43 | <0,001 |
| CDKN2BAS | Hs01390880_m1 | 4,16 | 3,26 | 1,87 | <0,001 | 4,35 | 3,58 | 1,70 | <0,001 |

n.d., *not determined*, wurde nicht gemessen

fettgedruckt = $p < 0,001$

In den Array-Daten zeigten sich für die untersuchten Gene keine 9p21.3 Haplotyp-spezifischen Expressionsunterschiede in allen Probanden, Zellarten und Stimulierungen. Für *CDKN2A* und *CDKN2B* konnte dies in der qPCR bestätigt werden, *MTAP* wurde nicht gemessen. Für die Expression von *CDKN2BAS* lieferten die beiden Methoden nicht das gleiche Ergebnis, die qPCR-Daten ergaben eine signifikant 1,5- bis 3-fach höhere Expression von *CDKN2BAS* in den Risiko-Gruppen. Dieser Expressionsunterschied war

sowohl in unbehandelten Monozyten gesunder Probanden als auch Makrophagen beider Kohorten vorhanden und blieb auch bei IFN γ -LPS oder 9cRA-T0901317 Stimulierung erhalten. Die starke Abweichung zwischen den beiden Untersuchungsmethoden lässt sich durch die unterschiedliche Lage der Sonden auf dem Array im 3'-Bereich (Exon 14-18) im Vergleich zu den Genexpressionsassays im 5'-Bereich (Exon 1-2 bzw. Exon 2-3) erklären, so dass vermutlich unterschiedliche Isoformen von *CDKN2BAS* detektiert wurden. Die Expression innerhalb des 5'- oder 3'-Bereichs von *CDKN2BAS* war in allen untersuchten Probanden und Zellen auch unter den verschiedenen Bedingungen einheitlich. Insgesamt erwies sich die Expression von *CDKN2BAS* als sehr niedrig.

3.9 Transkriptionsstart und Promotor von *CDKN2BAS*

Um den Promotor von *CDKN2BAS* in Monozyten charakterisieren zu können, wurde eine 5'-RACE durchgeführt (siehe 2.10), die das Ziel hatte, den genauen Transkriptionsstart des Gens zu definieren. Dabei wurde der Bereich von Exon 2 und 3, von dem aus der qPCR bekannt war, dass er in den gewählten Zellen exprimiert und amplifizierbar war, gewählt, um Gen-spezifische Primer zu definieren, die dann zusammen mit der Strategie von Clontech verwendet wurden, um das 5'-Ende möglichst vollständig zu amplifizieren. Mit RNA aus Monozyten eines gesunden Probanden (Träger des 9p21.3 nicht-risiko Haplotyps) konnte mit Hilfe der erzeugten cDNA ein PCR-Produkt amplifiziert werden, das die nach bekannter Annotation zu erwartende Größe hatte. Klonierung und Sequenzierung mehrerer Klone bestätigten, dass es sich dabei um den 5'-Bereich von *CDKN2BAS* handelte. Im Vergleich zur bekannten Annotation (Referenzgenom *NCBI36/Hg18, March 2006*) fehlten die ersten 31 Basen am 5'-Ende (Abbildung 25).

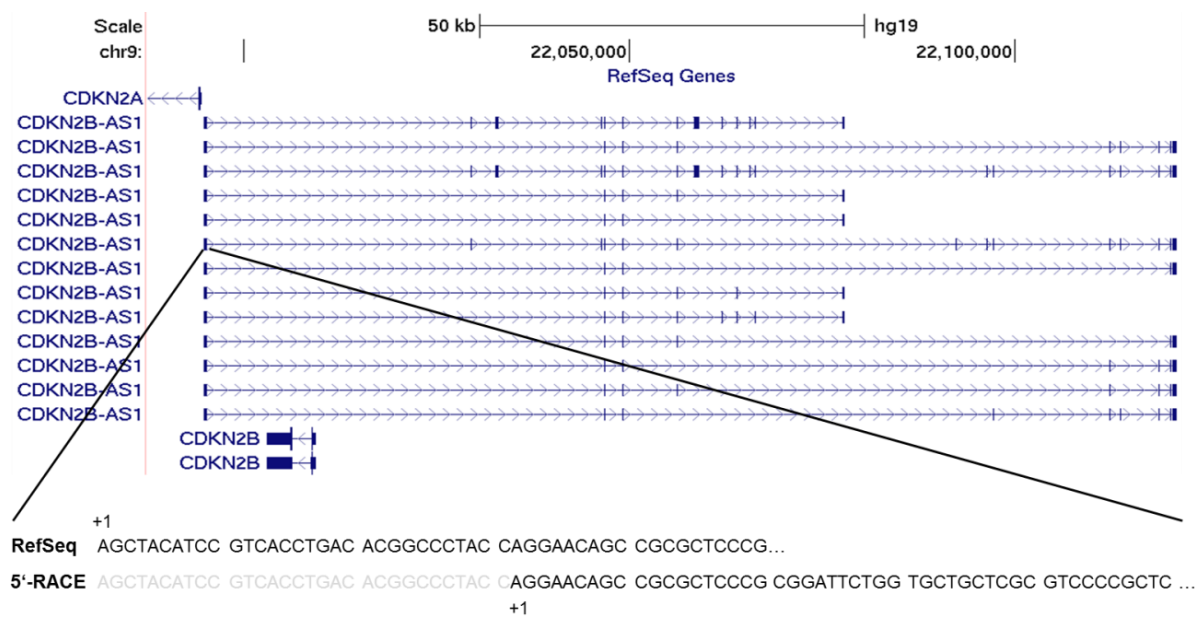


Abbildung 25: 5'-Ende von *CDKN2BAS* nach RefSeq-Annotation im Vergleich zur 5'-RACE in Monozyten.

Die 5'-RACE von *CDKN2BAS* ergab im Vergleich zur bekannten Annotation ein um 31 Basen kürzeres 5'-Ende. Es sind von beiden Sequenzen die ersten 50 Basen dargestellt.

Um zu untersuchen, ob dieser Unterschied im 5'-Ende Auswirkungen auf die Transkription haben könnte, wurden für beide Transkriptionsstarts die Bindestellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren im *core* Promotor-Bereich von 30 Basen *upstream* des +1 ermittelt und verglichen. Für die annotierte Sequenz ergab sich lediglich eine Bindestelle für das Zinkfingerprotein PLAG1 (*Pleomorphic adenoma gene 1*) auf dem (-) Strang, die in 33 % der Vertebraten-Promotoren vorkommt. Im Gegensatz dazu wurden im *core* Promotor-Bereich des alternativen 5'-Endes 12 Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt (Tabelle 15). Darunter fanden sich unter anderem das palindromische Sequenzmotiv für den basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor DEC1 sowie für den Cyclin D-interagierenden Myb-ähnlichen Transkriptionsfaktor 1 (DMTF1). Die zufälligen Erwartungswerte dieser Sequenzen ergab, dass es sich um teilweise sehr seltene Sequenzmotive handelt, ebenso zeigten die Häufigkeiten der Bindestellen an, dass diese meist in weniger als einem Drittel der Promotoren in Vertebraten zu finden sind. In beiden Promotor-Bereichen war keine TATA-Box vorhanden.

Tabelle 15: Transkriptionsfaktor-Bindestellen im alternativen Promotor von *CDKN2BAS* in Monozyten

| bindende Transkriptionsfaktoren | Familie/Beschreibung | Strang | Sequenz * | zufälliger Erwartungswert (Matches pro 1000 bp) | Häufigkeit der Bindestelle in Vertebraten-Promotoren, % |
|----------------------------------|---|--------|--|---|---|
| DMP1 = DMTF1 | <i>cyclin-D binding myb-like transcription factor 1</i> | (-) | knc ccGGATg tnr | 0,40 | 19,1 |
| MYBL1 = AMYB | <i>avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1</i> | (-) | nnta ACGGt tnn | 1,98 | 29,4 |
| CREB1 | <i>cAMP-responsive element binding protein</i> | (-) | nkgr TGACg ynn | 0,47 | 18,6 |
| OVOL1 | <i>OVO homolog-like 1</i> | (+) | rwmw ccGTTA nbt nb | 0,11 | 40,9 |
| EOMES = TBR2 | <i>Eomesodermin</i> | (-) | nn aGGTGt ygnn | 2,71 | 18,9 |
| TR2 | <i>Nuclear hormone receptor TR2</i> | (-) | dn aggtc annnnna GGTC aba | 0,01 | 19,5 |
| MEIS1A-HOX9A | <i>Meis homeobox 1 und homeobox A9</i> | (-) | TGACagk ttwayga | 0,02 | 27,3 |
| BHLHE40 = DEC1 = STRA13 = SHARP2 | <i>basic helix-loop-helix family, member e40</i> | (-) | nyst CACGt gabnn | 0,05 | 9,9 |
| USF1, USF2 | <i>upstream transcription factor 1 und 2</i> | (+) | mngy CACRt grnn | 0,34 | 22,9 |
| BHLHE40 = DEC1 = STRA13 = SHARP2 | <i>basic helix-loop-helix family, member e40</i> | (+) | nyst CACGt gabnn | 0,05 | 9,9 |
| SIX1, SIX4, SIX5 | <i>SIX homeobox1, 4 und 5</i> | (-) | nn TCAGgt tnc | 1,81 | 22,8 |
| HIF-1 | <i>hypoxia inducible factor 1</i> | (+) | nvm CACG ymyy | 3,70 | 18,7 |

* Nukleotide in rot zeigen einen hohen Informationsgehalt/hohe Konservierung an; Großbuchstaben bezeichnen die core Sequenz, die vom MatInspector verwendet wurde

3.10 Epigenetik – DNA-Methylierung auf Chromosom 9p21.3

Das Methylierungsmuster der genomischen DNA aus Monozyten gesunder Probanden wurde mit Hilfe von Bisulfit-Behandlung und anschließender Analyse der Massenunterschiede zwischen methylierter und nicht-methylierter DNA untersucht und zwischen Trägern des risiko und nicht-risiko Haplotyps verglichen (siehe 2.12). Bei manchen Primerpaaren sowie einzelnen DNA-Proben wurden Ausfälle beobachtet. In diesen Fällen konnte kein Methylierungswert ermittelt werden, so dass die entsprechenden Gruppenmittelwerte jeweils aus den vorliegenden Werten berechnet wurden. In Tabelle 16 ist für die untersuchten Amplikons die mittlere Methylierung (0-100 %) aller enthaltenen CpGs für die beiden Haplotyp-Gruppen zusammengefasst. Die Mittelwerte der einzelnen CpGs sind mit einem p-Wert für den Vergleich zwischen risiko und nicht-risiko in Tabelle 17 aufgelistet. Die Anzahl der untersuchten CpGs gibt die Zahl der CpGs pro Amplikon an, die bei der Analyse eindeutig einem bei der T-spezifischen Spaltung entstandenen Fragment zugeordnet werden konnten, außerdem ist die Gesamtzahl der in einem Amplikon enthaltenen CpGs angegeben. Teilweise konnte nicht jedem einzelnen CpG ein

Methylierungswert zugewiesen werden, wenn mehr als ein CpG in demselben Spaltungsprodukt auftrat. Benachbarte CpGs, v.a. in CpG-Inseln, weisen meist den gleichen Methylierungsstatus auf, wie auch hier zu sehen war. Insgesamt zeigte sich, wie in Abbildung 26 graphisch dargestellt ist, dass in den Promotorbereichen von *CDKN2A* und *CDKN2B* sowie der möglichen Promotorregion von *CDKN2BAS* (*CDKN2B_1*, 2, *CDKN2BAS_2*, 3, 4, 5, 6) kaum Methylierung vorlag. Nur einzelne CpGs wiesen eine Methylierung von mehr als 10 % auf (CpG 23 und 29 im Amplikon *CDKN2BAS_2* und CpGs 9-12 im Amplikon *CDKN2B_1*, Tabelle 17). Starke Methylierung war dagegen in der Region eines möglichen alternativen Promotors von *CDKN2B* (*CDKN2BAS_8*) zu beobachten. Dies traf auch auf die Amplikons in der *Enhancer*-Region ECAD9 zu (*ECAD9_1*, 2, 3, 5, 6). Der Vergleich zwischen den beiden 9p21.3 Haplotyp-Gruppen zeigte einen nominell signifikanten Unterschied für das Amplikon *CDKN2BAS_8* ($p=0,004$), das einen möglichen alternativen Promotor für *CDKN2B* im Intronbereich von *CDKN2BAS* abbildet. Außerdem wurden signifikante Methylierungsunterschiede für jeweils ein einzelnes CpG bzw. ein CpG-Paar in den Amplikons *CDKN2BAS_2* (Nr. 30), *CDKN2B_1* (Nr. 13,14) und *ECAD9_5* (Nr. 2) beobachtet. Das in der Risiko-Gruppe signifikant weniger methylierte CpG Nr. 2 im Amplikon *ECAD9_5* liegt neben dem SNP rs10757278, dessen mit KHK assoziiertes Risiko-Allel die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor STAT1 im *Enhancer* zerstört (Harismendy *et al.*, 2011) (Abbildung 27). Für das CpG direkt in der STAT1-Bindestelle liegen keine Methylierungswerte vor, da dieses nicht in einem auswertbaren Spaltungsfragment lag.

Tabelle 16: Mittlerer Methylierungsstatus der untersuchten Amplikons

| Amplikon | Anzahl untersuchter CpGs (Gesamtzahl CpGs) | Mittelwert, % nicht-risiko | Mittelwert, % risiko | p-Wert risiko vs nicht-risiko |
|-----------------|---|-------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| CDKN2BAS_2 | 14 (33) | 4,6 | 4,4 | 0,687 |
| CDKN2BAS_3 | 19 (29) | 2,0 | 2,1 | 0,645 |
| CDKN2BAS_4 | 11 (28) | 1,4 | 2,2 | 0,104 |
| CDKN2BAS_5 | 6 (13) | 1,7 | 1,8 | 0,733 |
| CDKN2BAS_6 | 16 (29) | 1,7 | 2,1 | 0,234 |
| CDKN2BAS_8 | 9 (10) | 76,3 | 72,3 | 0,004 |
| CDKN2B_1 | 18 (31) | 3,1 | 3,2 | 1,00 |
| CDKN2B_2 | 25 (41) | 1,8 | 1,7 | 0,689 |
| ECAD9_1,2,3,5,6 | 10 (19) | 85,6 | 84,6 | 0,135 |

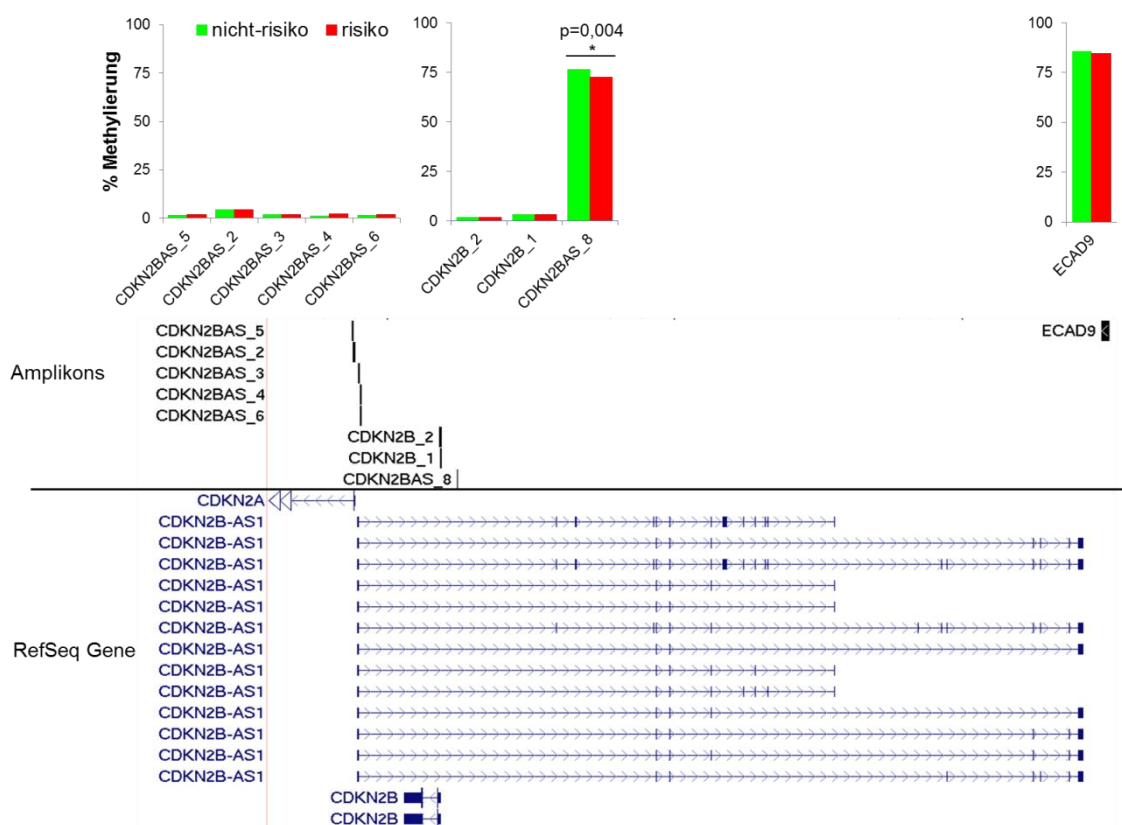
fettgedruckt = $p < 0,05$ 

Abbildung 26: Mittlerer Methylierungsstatus der untersuchten Amplikons.

Oberhalb der RefSeq Gene und den untersuchten Amplikons ist die mittlere Methylierung der einzelnen Amplikons für Träger des 9p21.3 Risiko-Haplotyps (rot) und Träger des nicht-risiko Haplotyps (grün) dargestellt.

Tabelle 17: Mittlerer Methylierungsstatus der einzelnen CpGs

| Amplikon | CpG Nr. * | Mittelwert, % nicht-risiko | Mittelwert, % risiko | p-Wert risiko vs nicht-risiko |
|------------|----------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| CDKN2BAS_2 | 2, 3 | 1,3 | 0,8 | 0,300 |
| CDKN2BAS_2 | 4, 5 | 0,3 | 0,5 | 0,515 |
| CDKN2BAS_2 | 7, 8 | 0,3 | 0,0 | 0,092 |
| CDKN2BAS_2 | 9 | 1,8 | 2,1 | 0,652 |
| CDKN2BAS_2 | 10 | 3,0 | 3,4 | 0,644 |
| CDKN2BAS_2 | 19 | 3,3 | 2,7 | 0,146 |
| CDKN2BAS_2 | 23 | 14,6 | 14,8 | 0,932 |
| CDKN2BAS_2 | 29 | 16,4 | 14,8 | 0,248 |
| CDKN2BAS_2 | 30 | 0,8 | 1,5 | 0,032 |
| CDKN2BAS_2 | 31, 32 | 3,9 | 3,7 | 0,736 |
| CDKN2BAS_3 | 1 | 2,0 | 2,0 | 0,878 |
| CDKN2BAS_3 | 2, 3, 4 | 1,4 | 2,0 | 0,328 |
| CDKN2BAS_3 | 7, 8 | 0,9 | 0,3 | 0,574 |
| CDKN2BAS_3 | 9, 10 | 4,1 | 2,9 | 0,335 |
| CDKN2BAS_3 | 11, 12 | 3,6 | 1,6 | 0,105 |
| CDKN2BAS_3 | 13, 14 | 0,8 | 0,6 | 0,798 |
| CDKN2BAS_3 | 15 | 2,4 | 3,9 | 0,105 |
| CDKN2BAS_3 | 17, 18, 19, 20 | 3,7 | 3,0 | 0,405 |
| CDKN2BAS_3 | 24 | 0,4 | 1,3 | 0,878 |
| CDKN2BAS_3 | 25 | 3,0 | 3,8 | 0,721 |
| CDKN2BAS_4 | 4, 5 | 2,3 | 5,6 | 0,628 |
| CDKN2BAS_4 | 14, 15 | 0,7 | 0,4 | 0,461 |
| CDKN2BAS_4 | 18, 19, 20 | 0,8 | 0,1 | 0,932 |
| CDKN2BAS_4 | 24 | 0,7 | 2,1 | 0,260 |
| CDKN2BAS_4 | 25, 26, 27 | 2,6 | 3,0 | 0,515 |
| CDKN2BAS_5 | 1 | 5,9 | 5,0 | 0,398 |
| CDKN2BAS_5 | 4 | 0,7 | 1,1 | 0,144 |
| CDKN2BAS_5 | 5 | 0,2 | 0,5 | 0,091 |
| CDKN2BAS_5 | 10 | 0,3 | 0,1 | 0,599 |
| CDKN2BAS_5 | 11, 12 | 1,3 | 2,2 | 0,068 |
| CDKN2BAS_6 | 1 | 1,0 | 0,6 | 0,295 |
| CDKN2BAS_6 | 3, 4 | 1,2 | 1,6 | 0,427 |
| CDKN2BAS_6 | 14 | 1,0 | 0,6 | 0,234 |
| CDKN2BAS_6 | 15, 16, 17 | 3,0 | 3,3 | 0,599 |
| CDKN2BAS_6 | 18, 19, 20 | 2,5 | 4,5 | 0,065 |
| CDKN2BAS_6 | 21 | 1,7 | 1,6 | 0,945 |
| CDKN2BAS_6 | 22, 23 | 0,3 | 1,4 | 0,138 |
| CDKN2BAS_6 | 24, 25 | 3,8 | 3,6 | 0,708 |
| CDKN2BAS_6 | 29 | 0,5 | 2,1 | 0,101 |

| Amplikon | CpG Nr. * | Mittelwert, % nicht-risiko | Mittelwert, % risiko | p-Wert risiko vs nicht-risiko |
|------------|----------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| CDKN2BAS_8 | 1 | 83,7 | 74,4 | 0,055 |
| CDKN2BAS_8 | 3 | 57,9 | 54,6 | 0,480 |
| CDKN2BAS_8 | 4 | 95,1 | 94,8 | 0,872 |
| CDKN2BAS_8 | 5 | 54,5 | 48,7 | 0,363 |
| CDKN2BAS_8 | 6 | 76,6 | 71,4 | 0,185 |
| CDKN2BAS_8 | 7 | 63,0 | 58,1 | 0,267 |
| CDKN2BAS_8 | 8 | 88,5 | 87,3 | 0,975 |
| CDKN2BAS_8 | 9, 10 | 91,0 | 89,5 | 0,709 |
| CDKN2B_1 | 2, 3 | 0,1 | 0,1 | 1,00 |
| CDKN2B_1 | 6, 7 | 3,2 | 2,8 | 0,588 |
| CDKN2B_1 | 8 | 0,4 | 1,1 | 0,472 |
| CDKN2B_1 | 9, 10, 11, 12 | 11,8 | 11,2 | 0,396 |
| CDKN2B_1 | 13, 14 | 3,2 | 4,3 | 0,035 |
| CDKN2B_1 | 15 | 0,0 | 0,0 | 1,00 |
| CDKN2B_1 | 16 | 2,1 | 1,8 | 0,712 |
| CDKN2B_1 | 17, 18 | 8,7 | 8,6 | 0,618 |
| CDKN2B_1 | 23, 24 | 0,3 | 0,4 | 0,841 |
| CDKN2B_1 | 28 | 1,8 | 1,8 | 0,924 |
| CDKN2B_2 | 5 | 0,5 | 1,0 | 0,189 |
| CDKN2B_2 | 6, 7, 8 | 2,9 | 2,5 | 0,477 |
| CDKN2B_2 | 11, 12, 13 | 2,3 | 2,0 | 0,922 |
| CDKN2B_2 | 15, 16 | 0,7 | 0,2 | 0,608 |
| CDKN2B_2 | 19, 20 | 2,7 | 2,1 | 0,238 |
| CDKN2B_2 | 21 | 1,4 | 1,2 | 0,539 |
| CDKN2B_2 | 22, 23, 24, 25 | 1,7 | 1,4 | 0,841 |
| CDKN2B_2 | 26, 27 | 4,2 | 3,9 | 0,701 |
| CDKN2B_2 | 28 | 0,0 | 0,0 | 1,00 |
| CDKN2B_2 | 29 | 1,4 | 1,5 | 0,848 |
| CDKN2B_2 | 30, 31 | 5,7 | 6,1 | 0,756 |
| CDKN2B_2 | 36, 37 | 0,1 | 0,4 | 0,462 |
| CDKN2B_2 | 41 | 0,6 | 0,4 | 0,968 |
| ECAD9_2 | 1 | 93,0 | 87,8 | 0,066 |
| ECAD9_2 | 3 | 86,0 | 85,6 | 0,877 |
| ECAD9_3 | 4 | 72,4 | 73,4 | 0,784 |
| ECAD9_3 | 6 | 62,0 | 59,6 | 0,662 |
| ECAD9_5 | 1 | 94,1 | 93,5 | 0,560 |
| ECAD9_5 | 2 | 89,5 | 85,0 | 0,006 |

* CpGs mit Ausfällen ≥ 50 % in einer Haplotyp-Gruppe wurden weggelassen
fettgedruckt = $p < 0,05$

GAGGTTAAGTGATGAGAAATTACTACAAAAAATTTAAAG

CpG Nr. 1

ACAGAAATAAGCATAATATTTGTTTGTATAAAAGGCGTT

ACAATTAAAGAGAGAGAGAGAAGGAGAACTACTCTGT

CpG Nr. 2

CpG Nr. 3

CTTGATTCTGCATCGCTGC T/C TACCGGAATGACCACAC

↑
rs10757278

CCTGACTTGTCCCACAGCCCTGTCTGGCCTC

Abbildung 27: Amplikon ECAD9_5 mit Lage der CpGs und des SNPs rs10757278.

In orange sind die CpGs des Amplikons ECAD9_5 eingezeichnet, in rot sind risiko bzw. nicht-risiko Allel des SNPs rs10757278 angegeben. Der unterstrichene Bereich stellt die STAT1-Bindestelle dar, neben der sich das in der 9p21.3 nicht-risiko Gruppe signifikant stärker methylierte CpG Nr. 2 befindet. Für das CG-Dinukleotid Nr. 3 innerhalb der STAT1-Bindestelle liegen keine Methylierungswerte vor.

4 Diskussion

4.1 Genomweite Genexpression humaner Makrophagen in Abhängigkeit des 9p21.3 KHK Risiko-Locus

Unterschiede in der Genexpression können Einblicke in die Funktion genomischer Regionen geben, die mit einer Krankheit assoziiert sind (Zeller *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde der bekannte Locus auf Chromosom 9p21.3 hinsichtlich seiner Rolle in Atherosklerose und KHK/HI mit Hilfe von humanen Makrophagen untersucht. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie an der Entstehung und dem Verlauf von Atherosklerose beteiligt sind (Lusis, 2000). Pro-inflammatorische Faktoren können ebenso wie eine Infektion, Hyperlipidämie und modifizierte LDL-Partikel zur Aktivierung von Endothelzellen führen, wodurch eine Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen initiiert wird. Nach Transmigration in die Intima differenzieren die Monozyten zu Makrophagen, welche dann oxidiertes LDL aufnehmen und sich in Schaumzellen umwandeln, was zur Bildung von Plaques führt. Diese können schließlich aufbrechen und eine Thrombose auslösen, was zu akuten vaskulären Ereignissen führt (Glass und Witztum, 2001). Es ist seit langer Zeit bestens bekannt, dass IFN γ und LPS neben vielen anderen Substanzen oder Signalen Makrophagen stark aktivieren können (Gui *et al.*, 2012; Hamilton und Adams, 1987). IFN γ ist ein starker Makrophagen-aktivierender Faktor sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, der zu einer Primärantwort der Zellen führt. Der Bestandteil der bakteriellen Zellwand LPS fungiert als Infektionsauslöser und aktiviert dadurch die Makrophagen vollständig, die dann beispielsweise mit induzierter Sekretion von IL2, IL6, IL1 und TNF α reagieren. Ebenso führen oxidierte LDL-Partikel zur Aktivierung von Makrophagen und bewirken die Produktion von Interleukinen, TNF α und TGF β . Um eine Überversorgung an Lipiden verarbeiten zu können, aktivieren Makrophagen außerdem Mechanismen zum reversen Cholesterin-Transport aus den Zellen heraus. Hierzu zählt beispielsweise die Hochregulation von ABC-Transporterproteinen (Costet *et al.*, 2003). Auch in dieser Studie wurden, wie erwartet, die pro-inflammatorische Antwort von Makrophagen sowie das Ansprechen auf Hyperlipidämie bei den *in vitro* simulierten Bedingungen deutlich sichtbar. So dienten Makrophagen, die von Probanden stratifiziert nach ihrem 9p21.3 Haplotyp isoliert wurden, als Modell, um die globale Genexpression sowie regulatorische Unterschiede aufgrund des 9p21.3 Risiko-Haplotyps nach atherogener Stimulierung der Zellen zu untersuchen.

Die genetischen Effekte auf die Anfälligkeit für KHK und HI wurden als relativ klein im Vergleich zu klassischen Risikofaktoren diskutiert (Manolio *et al.*, 2009). Das trifft auch auf den 9p21.3 Locus mit *odds ratios* (OR) zwischen 1,20 und 1,35 zu (Holdt und Teupser, 2012). Obwohl der 9p21.3 Locus die stärkste genetische Risikoerhöhung aufweist, konnten in dieser Arbeit keine signifikanten genomweiten Genexpressionsunterschiede in unstimuliertem Grundzustand zwischen den beiden Haplotyp-Gruppen gesunder Probanden detektiert werden. Somit scheinen auch die zellulären Effekte dieses genetischen Risiko-Locus tatsächlich so gering zu sein, wie die kleinen OR vermuten lassen.

Signifikante Unterschiede ergab der Vergleich der genomweiten Genexpression in Makrophagen aus Herzinfarkt-Patienten homozygot für den Risiko-Haplotyp mit der Expression der nicht-risiko Gruppe. In der Risiko-Gruppe waren beispielsweise die Chemokine *CCL8* (=MCP-2) und *CCL2* (=MCP-1) höher exprimiert. Beide *Monocyte Chemoattractant* Proteine (MCPs) der CC Chemokin Familie sind Liganden für den CCR2 Rezeptor und aktivieren verschiedene inflammatorische Zellen wie Monozyten und T-Zellen (Baggiolini *et al.*, 1997). In der Atherosklerose führt diese Aktivierung einerseits zur Zellmigration von der Media in die Intima und andererseits verursachen diese Chemokine innerhalb der Läsionen Proliferation und Transmigration von glatten Muskelzellen (Braunersreuther *et al.*, 2007). Erhöhte Spiegel beider Chemokine in Makrophagen der 9p21.3 Risiko-Gruppe könnten eine höhere Anfälligkeit für Atherosklerose vermitteln. Außerdem waren die beiden C-Typ Lektine CLEC4E (=Mincle) und CLEC5A (=MDL-1) höher exprimiert in Zellen von Patienten, die homozygot für den Risiko-Haplotyp waren. Von beiden ist beschrieben, dass sie in aktivierten Makrophagen exprimiert werden und eine Rolle in der Immunabwehr spielen (Batliner *et al.*, 2011; Miyake *et al.*, 2010). Durch Ligandenbindung kommt es zur Assoziation mit Adapterproteinen, die konservierte Peptid-Abschnitte, sogenannte *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) enthalten. Durch Phosphorylierung von ITAM werden die Rezeptoren aktiviert, was eine Signalkaskade in Gang setzt, die schließlich zur Makrophagenaktivierung und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen führt (Batliner *et al.*, 2011; Miyake *et al.*, 2010). Höhere mRNA-Spiegel dieser Lektine in Makrophagen aus Patienten mit dem 9p21.3 Risiko-Haplotyp könnten daher dazu beitragen, das höhere genetische Risiko für die Entstehung von Atherosklerose zu vermitteln.

Im unstimulierten Grundzustand waren nur in Makrophagen von HI-Patienten einige Unterschiede in der Genexpression basierend auf dem 9p21.3 Haplotyp zu sehen, nicht aber bei gesunden Probanden. Durch atherogene Behandlung der Zellen wurden *in vitro* Aspekte des Krankheitsbildes nachgeahmt und dabei Veränderungen der Zellen auf

Genexpressionsebene verfolgt. Es wurde die Hypothese geprüft, ob sich der genetische Effekt des Risiko-Locus auf Chromosom 9p21.3 dadurch auswirkt, dass die Zellen abhängig vom 9p21.3 Haplotyp in Folge von pro-inflammatorischer Aktivierung oder Lipidüberladung unterschiedliche Gene an- oder abschalten oder die Genregulation in unterschiedlichem Ausmaß erfolgt. In mit 9cRA-T0901317 behandelten Makrophagen von HI-Patienten zeigte das *EMR3*-Gen in Trägern des Risiko-Haplotyps eine 2-fach niedrigere Expression als in HI-Patienten, die homozygot für den nicht-risiko Haplotyp sind (Daten für Zellen der gesunden Probanden wurden für diese Stimulierung nicht erhoben). Die genaue Funktion von *EMR3* ist nicht bekannt, es handelt sich dabei um ein Mitglied einer Untergruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren (*epidermal growth factor* (EGF)-TM7), die hauptsächlich von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Stacey *et al.*, 2001). Ein Ligand für *EMR3* auf von Monozyten abstammenden Makrophagen und aktivierten Neutrophilen und seine Zugehörigkeit zu der EGF-TM7 Rezeptor-Familie lassen vermuten, dass der Rezeptor während inflammatorischen Prozessen eine Rolle bei der Interaktion von myeloiden Zellen untereinander spielen könnte. Außerdem bestehen Hinweise darauf, dass *EMR3* durch fehlerhafte Expression in Tumorzellen diesen das Einwandern in benachbarte Gewebe ermöglicht (Kane *et al.*, 2010). Allerdings kann derzeit nur spekuliert werden, ob und wie die niedrigere Expression dieses Gens in Makrophagen von HI-Patienten mit 9p21.3 Risiko-Haplotyp Einfluss auf die höhere Suszeptibilität für KHK vermitteln könnte. Durch die Stimulierung der Makrophagen mit 9cRA-T0901317 wird über RXR-LXR-Aktivierung die „Bekämpfung“ der Atherosklerose induziert. Möglicherweise ist die niedrigere Expression von *EMR3* in der Risikogruppe ein Zeichen schlechteren Ansprechens auf die Induktion anti-atherogener Mechanismen in den Zellen und bewirkt eine schlechtere Zell-Zell-Kommunikation in den inflammatorischen Prozessen und somit eine höhere Anfälligkeit für das Fortschreiten der Atherosklerose.

Insgesamt waren diese Haplotyp-spezifischen Expressionsunterschiede relativ gering. In der komplexen Ätiologie der Atherosklerose spielen Endothelzellen und glatte Muskelzellen eine wichtige Rolle. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der zelluläre Effekt des 9p21.3 Locus in diesen Zellen stärker zu sehen wäre. Ein Mausmodell mit einer Deletion der Region, die ortholog zu dem menschlichen 58 kb Intervall ist, hat eine Beteiligung von *CDKN2BAS* in übermäßiger Proliferation und verringertem Alterungsprozess in Primärkulturen von glatten Muskelzellen der Aorta gezeigt, einem Phänotyp, der mit beschleunigtem Verlauf von KHK verbunden ist (Visel *et al.*, 2010). Eine Assoziation des 9p21.3 Risiko-Genotyps mit erhöhter Proliferation konnte auch in Primärkulturen von humanen glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Motterle *et al.*, 2012). In gesunden humanen Trägern des 9p21.3

Risiko-Allels waren Gensets und Signalwege, die mit erhöhter Zellproliferation assoziiert sind, hochreguliert im Vergleich zu Trägern des Referenz-Allels (Jarinova *et al.*, 2009). In Herzgewebe gaben aufgrund des 9p21.3 Risiko-Allels differenziell exprimierte Gene Hinweise darauf, dass durch Aktivierung des Signalwegs zum Durchlaufen der G1-Phase des Zellzyklus ein proliferativer Phänotyp zustande kommt, der durch Gefäßveränderungen zum erhöhten KHK-Risiko führt (Pilbrow *et al.*, 2012). Um die hier durchgeführte allelspezifische Expressionsstudie in humanen Makrophagen auf solche Zellsysteme auszuweiten, die nur schwer zugänglich sind, könnte mit der Technologie der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) Abhilfe geschaffen werden. Bei dieser Technologie erfolgt eine Rückprogrammierung von humanen Hautfibroblasten oder Lymphozyten zu iPS, die anschließend in verschiedenste Zellarten differenziert werden können (Yamanaka, 2009; Yamanaka, 2012). Diese Technologie bietet die Möglichkeit, von Trägern des Risiko-Allels beispielsweise Patienten-spezifische Endothelzellen zu generieren und diese Zellen hinsichtlich der Genexpression oder anderer Effekte mit iPS-generierten Endothelzellen aus nicht-risiko Probanden zu vergleichen.

Es wird immer mehr bekannt, dass genetische Veranlagung und Umwelteinflüsse zusammenspielen. Eine Studie mit sowohl HI-Patienten als auch gesunden Probanden konnte eine Interaktion zwischen 9p21.3 Risiko-Varianten und dem Umweltfaktor Ernährung zeigen (Do *et al.*, 2011). Träger des Risiko-Allels, die eine Obst- und Gemüse-arme Ernährungsweise hatten, hatten ein höheres Herzinfarkt-Risiko als Nicht-Träger. Auch verschiedene zeitliche Aspekte können relevant für die Entwicklung einer Krankheit sein. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Effekt durch die Stimulierungen untersucht, indem die Genexpressionsänderungen miteinander verglichen wurden (FC_{ratio}), anstatt nur die Expressionsstärken zu vergleichen (FC_{stim} risiko vs. nicht-risiko).

Dieser Vergleich zeigte, dass bei 9cRA-T0901317 Simulierung der Makrophagen von HI-Patienten eine Reihe von Genen in der Risiko-Gruppe stärker herunterreguliert wurde im Vergleich zu Trägern des nicht-risiko Haplotyps. Wie die *Gene Ontology*-Analyse ergab, handelte es sich dabei vor allem um Gene, die mit Zellzyklus, Zellteilung und Zellproliferation verbunden waren. In einer Studie mit genomweiter Expression in Gesamtblut von gesunden Risiko-Allel Trägern im Vergleich zu Trägern des Referenz-Allels konnte eine Hochregulation von Gensets und Signalwegen der Zellproliferation beobachtet werden (Jarinova *et al.*, 2009). Generell ist eine erhöhte Zellteilung und -proliferation insbesondere von glatten Muskelzellen, aber auch von Makrophagen (Rosenfeld und Ross, 1990) in fortschreitender Atherosklerose zu beobachten und würde somit mit höherer Suszeptibilität für KHK in Risiko-Allel Trägern übereinstimmen. Betrachtet man jedoch spezifisch die Makrophagen, die für

die erfolgreiche Bewältigung des reversen Cholesterin-Transports aus den Zellen verantwortlich sind (Shibata und Glass, 2010), so könnte eine stärkere Herunterregulation von Proliferations-assoziierten Genen in diesen Zellen der Risikogruppe einerseits eine weniger effektive Bewältigung des Cholesterins durch weniger zur Verfügung stehende Makrophagen bedeuten. Man müsste überprüfen, ob sich diese *in vitro* Unterschiede in der Genexpression auf die Proliferation der Makrophagen auswirken. Andererseits könnte der beobachtete Effekt auch ein Hinweis dafür sein, dass Makrophagen von Personen mit stabiler KHK bereits vorstimuliert sind und somit stärker auf erneute atherogene Stimuli ansprechen und mit größeren Genexpressionsänderungen auf die RXR-LXR Aktivierung reagieren. Vor allem in der Anfangsphase besteht noch ein Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Prozessen, das erst durch anhaltende pro-inflammatorische Signale und Lipidinfiltration zur Ausbildung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion führt (Ross, 1999). Dies erklärt auch die nicht ganz korrekt gewählte Bezeichnung „atherogen“ für die verwendeten Substanzen 9cRA und T0901317. In *in vivo* Studien in atherosklerotischen Mäusen haben diese Moleküle anti-atherogene Effekte gezeigt, die sich in verminderter Atherosklerose-Entwicklung (Claudel *et al.*, 2001; Terasaka *et al.*, 2003) und erhöhter HDL-Plasmakonzentration (Schultz *et al.*, 2000) äußerten. Natürlich gilt auch hier, dass in den Arterien anfänglich gegen eine entstehende Atherosklerose angegangen wird und eine Stimulierung insbesondere der Mechanismen des reversen Cholesterin-Transports zu einer verminderten Ausprägung der Atherosklerose führen kann. Die Imitation von hohem Cholesterin-Spiegel über Aktivierung von RXR-LXR in den nach 9p21.3 Haplotyp stratifizierten Makrophagen sollte zeigen, ob die Zellen basierend auf dem vorliegenden Haplotyp mit unterschiedlicher Genexpression und Genregulation auf diese Störung des normalen Gleichgewichts reagieren, um so möglicherweise Einblicke in den zellulären Effekt des 9p21.3 KHK Risiko-Locus zu bekommen.

Interessanterweise fanden sich *CCL8* und *CLEC5A* unter den Genen, die in der Risiko-Gruppe stärker herunterregulierten waren. Die beiden Gene waren bereits im Grundzustand in Makrophagen aus HI-Patienten differenziell exprimiert und könnten, wie vorher diskutiert, durch ihre höhere Expression in Trägern des Risiko-Allels zur erhöhten Suszeptibilität für KHK beitragen. Durch Behandlung mit 9cRA-T0901317 wurden *CCL8* und *CLEC5A* in der Risiko-Gruppe stärker herunterreguliert im Vergleich zu Zellen aus Trägern des nicht-risiko Allels. Das könnte bedeuten, dass hier speziell der Risiko-Locus beteiligt daran ist, eine Art „Gedächtnis“ zu vermitteln, und die Makrophagen der Risiko-Träger so stärker auf erneute atherogene Belastung reagieren. Das erworbene Immunsystem repräsentiert das Gedächtnis von Zellen bei Kontakt mit Antigenen. Makrophagen sind als Antigen-

präsentierende Zellen für die Aktivierung von T-Zellen Mitwirkende dieser Immunabwehrreaktion und prozessieren vor allem bei Hypercholesterinämie Komponenten des oxLDL für die Antigen-Präsentation (Hansson, 2001; Hartvigsen *et al.*, 2009). Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen erfolgt dann eine schnellere Abwehrreaktion, weshalb möglicherweise in der *in vitro* Studie nach der Zellstimulierung für 24 h ein stärkerer Effekt in den schon „immunisierten“ Zellen zu beobachten war, vermittelt über einen unbekannten Mechanismus durch den 9p21.3 Risiko-Locus.

Die meist noch prominentere pro-inflammatorische Antwort von Zellen auf die Behandlung mit IFN γ und LPS sind seit langem bekannt (Hamilton und Adams, 1987; Schroder *et al.*, 2004). Daher war der Vergleich der Genexpressionsänderungen durch diese Stimulierung zwischen Makrophagen von Trägern des 9p21.3 Risiko-Haplotyps mit denen der nicht-risiko Gruppe hier besonders interessant und es wurden auch Expressionsdaten von Zellen gesunder Probanden erhoben.

In diesem Rahmen zeigte sich eine geringere Hochregulation von Metallothioninen (MT) in Trägern des 9p21.3 Risiko-Haplotyps sowohl in gesunden Probanden als auch in HI-Patienten. Von der MT-Biosynthese wurde gezeigt, dass sie unter anderem von Zytokinen wie IL1, IL6, TNF α und IFN γ sowie verschiedenen Oxidantien gesteigert wird und MTs sind bereits im Zusammenhang mit oxidativem Stress und dem kardiovaskulären System beschrieben (Nath *et al.*, 2000). Die Herunterregulation von MTs korreliert mit einem erniedrigten Redox-Zustand und erhöhter Anfälligkeit für oxidativen Stress, einer der Ursachen für endotheliale Dysfunktion, die schließlich zur KHK führt. Die hier beobachtete geringere Hochregulation von MTs in den Risiko-Allel Trägern könnte einen niedrigeren Schutz gegen oxidativen Stress im Vergleich zu den nicht-risiko Gruppen bedeuten und so den genetischen Effekt des Risiko-Allels vermitteln, der in den GWAS für KHK gesehen wurde.

Außerdem zeigten *IL12B* und *IL1B*, zwei Interleukine, die im IFN γ Signalweg beteiligt sind, unterschiedliche Expressionsänderungen aufgrund des 9p21.3 Haplotyps in Gesunden und HI-Patienten. *IL12B* wird insbesondere als Reaktion auf Mikroorganismen und mikrobielle Produkte induziert, wobei die Regulation auf Transkriptionsebene unter anderem durch die Bindung von Faktoren der NF- κ B Familie an den *IL12B*-Promotor erfolgt (Murphy *et al.*, 1995). Der IL12-IFN γ Signalweg führt vor allem zur Induktion von zytotoxischen Faktoren, die in der zellulären Immunantwort für die Abwehr von Pathogenen und deren Beseitigung verantwortlich sind. Die stärkere Hochregulation der *IL12B*-Expression in Makrophagen von HI-Patienten homozygot für den 9p21.3 Risiko-Haplotyp im Vergleich zur nicht-risiko Gruppe

könnte somit eine bessere und schnellere Reaktion auf das pro-inflammatorische IFN γ und LPS darstellen. Dass der gleiche Effekt in gesunden Probanden zu sehen war, könnte bedeuten, dass der Risiko-Locus einen Effekt vermitteln, der diese stärkere Aktivierung der Makrophagen zur Phagozytose veranlasst und so in Trägern des Risiko-Allels zur erhöhten Suszeptibilität für KHK durch damit verbundene schnellere Ablagerung von abgestorbenen Zellen in den Arterien beiträgt. Das zweite Interleukin IL1 spielt eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem, wobei IL1A und IL1B von aktivierten Makrophagen exprimiert, pro-inflammatorische Proteine mit potenzierenden Effekten auf Proliferation, Differenzierung und Funktionen von Immunzellen darstellen (Akdis *et al.*, 2011). IL1B aktiviert außerdem umgebende Endothelzellen zur Vasodilatation und sorgt so für eine vermehrte Rekrutierung von Serumproteinen und Leukozyten zu den Entzündungsstellen. Sowohl in Makrophagen von gesunden Probanden als auch von HI-Patienten wurde *IL1B* durch IFN γ -LPS Stimulierung in Trägern des Risiko-Allels weniger stark hochreguliert im Vergleich zu den nicht-risiko Gruppen. Erklären lassen könnte sich das vielleicht durch die Beteiligung von IL1B am angeborenen Immunsystem, das hinsichtlich dieses Aspekts in der stärker gefährdeten KHK Risiko-Gruppe weniger gut zu funktionieren scheint als in der Referenz-Gruppe. Demnach würde eine geringere Hochregulation dieses Interleukins einen schlechteren Abwehrmechanismus gegen entstehende KHK in Trägern des 9p21.3 Risiko-Haplotyps bedeuten. Obwohl der Effekt der unterschiedlich regulierten Interleukine nur an der Schwelle zur Signifikanz war, unterstützt er das bereits beschriebene Konzept, dass IFN γ Genexpressionsänderungen abhängig vom 9p21.3 Risiko-Allel hervorruft (Harismendy *et al.*, 2011). Das KHK Risiko-Allel von zwei SNPs, die in einem *Enhancer* auf 9p21.3 gelegen sind, unterbrechen eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor STAT1, wodurch die Weiterleitung des IFN γ -Signals blockiert wird und sich eine geänderte Expression der benachbarten Gene ergibt. Allerdings war dieser Effekt auf die Genexpression nicht einheitlich in den verschiedenen untersuchten Zelltypen.

Außerdem war, wie bei Behandlung mit 9cRA-T0901317, auch bei Behandlung mit IFN γ -LPS *CCL8* bei den Genen zu finden, die zwischen Trägern des 9p21.3 Risiko-Haplotyps und Trägern des nicht-risiko Haplotyps unterschiedliche Expressionsänderungen zeigten. Durch die intensive pro-inflammatorische Stimulierung wurde das Gen in beiden Patientengruppen stark hochreguliert. Interessanterweise war der Effekt bei dieser Stimulierung stärker in Zellen der Träger des nicht-risiko Allels, in HI-Patienten war sogar eine etwa doppelt so starke Expressionsänderung zu beobachten. Die Funktion von *CCL8* (=MCP-2) ist kaum beschrieben im Gegensatz zu der von MCP-1 (=CCL2). Die starke strukturelle Ähnlichkeit der beiden Proteine lassen jedoch ähnliche Funktionen vermuten (Proost *et al.*, 1996). MCP-

1 wird in Endothelzellen und Makrophagen insbesondere durch IFN γ induziert und lockt Monozyten und T-Lymphozyten an, was ihm eine signifikante Rolle in der Atherosklerose zukommen lässt (McLaren und Ramji, 2009). In MCP-1-*Knockout*-Mäusen konnte eine verminderte Größe der atherosklerotischen Läsionen beobachtet werden (Boisvert, 2004) und in ApoE-defizienten Mäusen beschleunigte MCP-1 die Ausbreitung der Atherosklerose (Aiello *et al.*, 1999). Dem strukturell verwandten MCP-2 könnte ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques und KHK zukommen und damit möglicherweise auch eine Beteiligung an der durch den 9p21.3 Risiko-Locus vermittelten erhöhten Anfälligkeit für KHK. CCL8 zeigte sowohl in Makrophagen im Grundzustand als auch durch 9cRA-T0901317 und IFN γ -LPS Stimulierung unterschiedliche Expression und Regulation in Abhängigkeit des 9p21.3 KHK Risiko-Locus.

Die beachtlichsten Gene und *Pathways*, von denen im humanen Makrophagen-Modell durch genomweite Genexpression eine Abhängigkeit von den 9p21.3 Haplotypen beobachtet werden konnte, sind in Abbildung 28 zusammengefasst

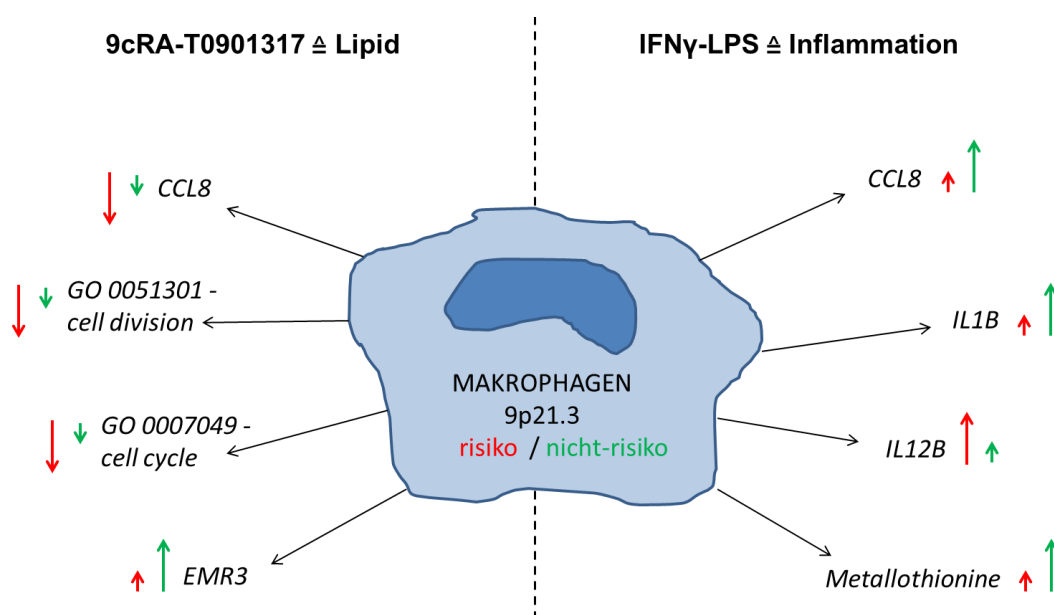


Abbildung 28: Modell der potenziellen (anti)atherogenen Wirkung der durch genomweite Genexpression gefundenen Gene bzgl. 9p21.3 Haplotypen im Makrophagen-Modell.

Gene und *Pathways* mit unterschiedlich starken Expressionsänderungen durch atherogene Stimulierung in humanen Makrophagen abhängig vom 9p21.3 KHK risiko (rot) bzw. nicht-risiko (grün) Haplotyp, die an der Vermittlung des zellulären Effekts des Assoziationsbefundes auf Chromosom 9p21.3 beteiligt sein könnten.

4.2 Expression und Regulation der Gene im 9p21.3 KHK Risiko-Locus

In der Vergangenheit wurde wiederholt ein möglicher Effekt des 9p21.3 KHK Risiko-Locus auf die Expression und Regulation der Gene in dieser Region diskutiert (Liu *et al.*, 2009; Jarinova *et al.*, 2009; Folkersen *et al.*, 2009; Holdt *et al.*, 2010; Cunnington *et al.*, 2010; Burd *et al.*, 2010; Motterle *et al.*, 2012). Zahlreiche Studien berichten in verschiedenen Zellsystemen von unterschiedlichen Zusammenhängen zwischen Risiko-Allelen und der Expression insbesondere von *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDKN2BAS* (Holdt und Teupser, 2012). Neben dem genomweiten Ansatz war dies ein Aspekt in dieser Arbeit. Übereinstimmend mit der bisher gezeigten stabilen Assoziation der Expression von *CDKN2BAS* mit dem Chromosom 9p21.3 Genotyp konnten signifikante Expressionsunterschiede zwischen Trägern des Risiko-Haplotyps und der Referenzgruppe beobachtet werden. *CDKN2BAS* war in Makrophagen von Trägern des Risiko-Haplotyps etwa 2-fach höher exprimiert. Allerdings war dieser Expressionsunterschied abhängig vom gewählten Detektionsbereich und gleich starke Expressionsspiegel wurden beim Nachweis im 3'-Bereich des Gens gemessen. Eine Erklärung dafür ist das Vorkommen verschieden langer Isoformen von *CDKN2BAS* (Folkersen *et al.*, 2009; Jarinova *et al.*, 2009). In Gesamtblut konnte sowohl eine verminderte Expression der langen Transkript-Variante als auch eine erhöhte Expression der kurzen Isoform in Trägern des Risiko-Allels beobachtet werden (Jarinova *et al.*, 2009), ähnliche Expressionsunterschiede waren in PBMCs und atherosklerotischen Plaques zu sehen (Holdt *et al.*, 2010). Eine Studie in T-Zellen berichtete außerdem verminderte Expression der Protein-kodierenden Transkripte *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* und *ARF* in Trägern des Risiko-Allels von rs10757278 (Liu *et al.*, 2009). Gleiches ergaben Untersuchungen in Primärkulturen von vaskulären glatten Muskelzellen mit dem Risiko-Genotyp auf rs1333049 bezogen (Motterle *et al.*, 2012). Diese beiden SNPs sind in perfektem LD ($r^2=1$) und rs1333049, der als *lead*-SNP im 9p21.3 Locus gilt, wurde auch in der vorliegenden Arbeit in die Definition des Haplotyps einbezogen. Dennoch konnte hier in den Makrophagen von gesunden Probanden oder HI-Patienten kein Expressionsunterschied von *CDKN2A* und *CDKN2B* basierend auf dem 9p21.3 Haplotyp beobachtet werden. Zum gleichen Ergebnis kam eine Genexpressionsstudie in Herzgewebe mit dem Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array (Pilbrow *et al.*, 2012). Um die Expression von *CDKN2BAS* und den möglichen Einfluss auf die Nachbargene einheitlicher erfassen zu können, stellte sich die Frage, welche Bereiche von *CDKN2BAS* in den jeweils untersuchten Zelltypen tatsächlich exprimiert werden und somit detektiert werden können. Mittels PCR-Amplifikation und RNA-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass in Epithelzellen und Fibroblasten der distale Bereich ab Exon 15 sowie die ersten Exons im 5'-Bereich stärker exprimiert werden

als die in der Mitte gelegenen (Burd *et al.*, 2010). Übereinstimmend damit ist die Beobachtung in dieser Arbeit, dass auch mit cDNA abgeleitet von Makrophagen-RNA nur Primer in Exon 1-2, 4-6 oder 15-19 zur spezifischen Amplifikation von *CDKN2BAS* führten (Ergebnisse nicht gezeigt, siehe Abbildung 29).

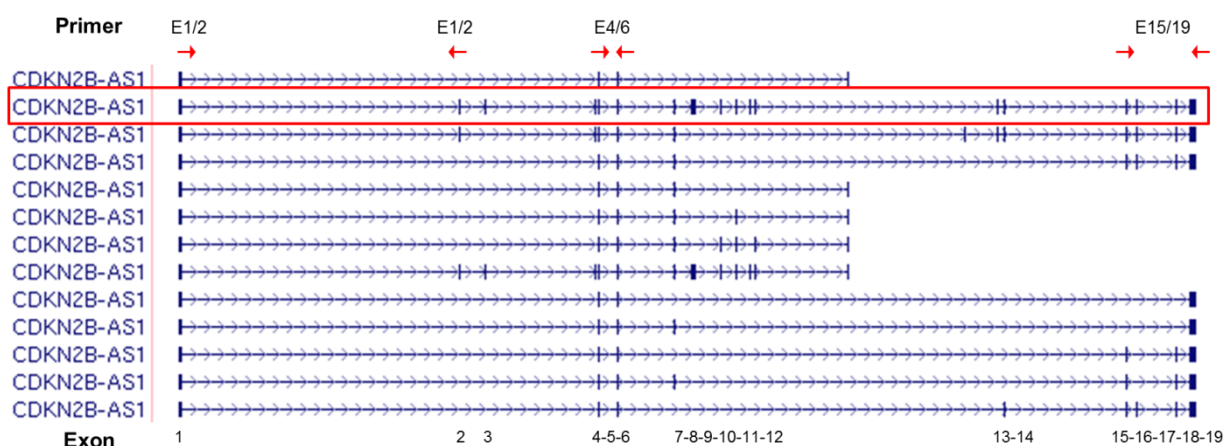


Abbildung 29: Primerpaare für die Amplifikation von *CDKN2BAS* mittels PCR.

Im oberen Bereich sind die Primerpaare (E1/2, E4/6 und E15/19) mit roten Pfeilen dargestellt, die zu einer spezifischen Amplifikation von *CDKN2BAS* geführt haben. Unterhalb der verschiedenen Isoformen des Gens sind die Exons anhand der längsten Variante (DQ485453, rot umrandet) nummeriert.

Der Nachweis des Zelltyp-spezifischen 5'-Endes und damit verbunden der ungefähren Lokalisierung des Transkriptionsstarts und Promotors in Monozyten ergab nur wenige Basen Abweichung von den Datenbank-Einträgen. Allerdings zeigte ein Vergleich der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den beiden *core* Promotor-Bereichen einen großen Unterschied. Für das annotierte Ende wurde lediglich eine Bindestelle für ein Zinkfingerprotein gefunden, dagegen enthielt die Sequenz der 5'-RACE 12 Sequenzmotive für Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlichen DNA-Bindedomänen, wie Homeodomänen (MEIS1, HOX9A), Leucin Zippern (CREB1, USF1 und 2) oder Helix-Loop-Helix Strukturen (DEC1). Auch wenn das Vorhandensein dieser Bindestellen nicht ausreichend ist für eine funktionelle Relevanz, ist der Unterschied in der Anzahl der Bindestellen in diesem kurzen Sequenzbereich dennoch bemerkenswert. Hinzu kommt die Seltenheit der identifizierten Sequenzmotive, was auf eine hohe Spezifität hindeuten könnte. DMTF1 wie auch MYBL1 wurden im Zusammenhang mit Zellproliferation und Differenzierung beschrieben (Hirai und Sherr, 1996; Litovchick *et al.*, 2007), so dass durch die Rekrutierung spezifischer Transkriptionsfaktoren eine Verbindung zwischen *CDKN2BAS* und dem Zellzyklus zustande kommen könnte. Von DMTF1 ist

bekannt, dass es mit D-Cyclinen interagiert und als Tumorsuppressor durch die Aktivierung der Transkription von *ARF* und dem ARF-p53 Signalweg zum Zellzyklus-Arrest oder zur Induktion von Apoptose führt. Aufgrund der intergenischen Region, die *CDKN2BAS* und *ARF* gemeinsam haben und von der in HeLa-Zellen gezeigt wurde, dass sie *in vitro* auf den Transkriptionsfaktor E2F1 anspricht, wurde eine koordinierte Regulation der beiden Genen postuliert (Sato *et al.*, 2010). Durch das Vorhandensein der Bindestelle für DMTF1 in der am 5'-Ende verkürzten Sequenz könnte es demnach möglich sein, dass in Monozyten durch diesen Transkriptionsfaktor eine gemeinsame Regulation der Transkription von *ARF* und des verkürzten *CDKN2BAS* erreicht wird. Neben den *core* Promotor-Elementen und den daran bindenden allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die für die Transkription fast aller Gene verantwortlich sind, spielen auch proximale Promotor-Elemente, *Enhancer* und *Silencer* eine Rolle. Außerdem ist schon seit Langem bekannt, dass Promotoren zusätzlich oft CpG-Inseln enthalten und durch deren Methylierungsstatus reguliert werden (Bird, 1987). Da in den beiden analysierten *core* Promotor-Sequenzen für *CDKN2BAS* keine TATA-Box vorhanden ist, könnte hier eine alternative Regulation über CpGs und deren Methylierungsstatus stattfinden, wie sie oft bei Promotoren ohne TATA-Box zu beobachten ist (Carninci *et al.*, 2006; Deaton und Bird, 2011). Auch in regulatorischen Elementen wie *Enhancern* ist eine Regulation durch DNA-Methylierung möglich. In der genomischen DNA von Monozyten wurde kaum Methylierung in den Promotorbereichen von *CDKN2A* und *CDKN2B* detektiert, was auf aktive Transkription hindeutet. Dagegen ist Hypermethylierung mit schlechter DNA-Zugänglichkeit für Transkriptionsaktivatoren und reprimierter Transkription assoziiert (Meissner *et al.*, 2008) und konnte in den Monozyten in dem möglichen alternativen Promotor/regulatorischen Element und der *Enhancer*-Region ECAD9 beobachtet werden. Der Vergleich zwischen den beiden 9p21.3 Haplotyp-Gruppen ergab nur im Bereich des Amplikons *CDKN2BAS_8* einen signifikanten Unterschied in der DNA-Methylierung. Bei dieser Region könnte es sich um einen alternativen Promotor oder um ein weiteres regulatorisches Element im 9p21.3 Locus in Monozyten/Makrophagen handeln. Allerdings war der Bereich in beiden Haplotyp-Gruppen stark methyliert (>70 %), was reprimierte Transkription und schlechte Zugänglichkeit für bindende Proteine vermuten lässt. Im *Enhancer* ECAD9 wurde an einem CpG eine signifikant stärkere Methylierung in Trägern des nicht-risiko Allels beobachtet. Dieses CpG ist direkt benachbart zum SNP rs10757278, von dem gezeigt wurde, dass dessen mit KHK assoziiertes Risiko-Allel die im *Enhancer* lokalisierte Bindestelle für den Transkriptionsfaktor STAT1 zerstört (Harismendy *et al.*, 2011). Möglicherweise hat eine unterschiedlich starke Methylierung in räumlicher Nähe zu der Bindestelle Auswirkungen auf die Zugänglichkeit der DNA für den Transkriptionsfaktor. Allerdings war das CpG-Dinukleotid in beiden Haplotyp-Gruppen stark methyliert (>80 %),

was insgesamt auf eine schlechte Zugänglichkeit für bindende Proteine hindeutet. STAT1 ist über den JAK/STAT-Signalweg in der Weiterleitung inflammatorischer Antworten involviert, die beispielsweise durch IFN γ hervorgerufen werden (van Boxel-Dezaire und Stark, 2007). Demnach könnte ein Einfluss des 9p21.3 KHK Risiko-Allels auf Ebene der DNA-Methylierung möglicherweise besser zu sehen sein, wenn dieser Signalweg in mit IFN γ behandelten Zellen direkt angeschaltet wird. Das Fehlen von deutlichen Haplotyp-spezifischen Unterschieden in der DNA-Methylierung korreliert mit der Expression der Gene im 9p21.3 Locus, die für beide Haplotyp-Gruppen gleich war. Der signifikante Expressionsunterschied von *CDKN2BAS* bei der Wahl des Detektionsbereichs im 5'-Bereich lässt sich vermutlich durch verschiedene Isoformen erklären. Neben dem anfänglichen Nachweis von drei Varianten des Gens (Jarinova *et al.*, 2009) kamen im Laufe der Zeit neue Varianten und alternative Exons hinzu, die in Intronbereichen der bis dahin bekannten Isoformen gelegen waren (Folkersen *et al.*, 2009). Sehr komplex wurde das Expressionsmuster von *CDKN2BAS* mit der Entdeckung zirkulärer und transgespleißter Formen (Burd *et al.*, 2010), die von der linearen genomischen Sequenz abwichen. Um für Expressionsmessungen nicht auf Sonden beschränkt zu sein, die anhand bekannter Annotation entwickelt wurden, wurde im Exon Array ein hoher Informationsgehalt durch Sonden basierend auf *in silico* Vorhersagen eingeschlossen. Allerdings wird dadurch die Datenauswertung sehr komplex und enthält auf Grund der auf Vorhersagen basierenden Sequenzinformationen einen großen Anteil an Artefakten. Ohne Annotationsbias arbeiten dagegen Techniken wie die RNA-Sequenzierung, bei der das gesamte Transkriptom mit Hilfe von Hochdurchsatz-Plattformen parallel sequenziert und anschließend passenden Sequenzen des Genoms zugeordnet wird (Ozsolak und Milos, 2011). Dadurch lassen sich tatsächlich in den untersuchten Zellen exprimierte Transkripte identifizieren und man erhält ein detailliertes Expressionsmuster. Der nächste Schritt wäre dann, die zu Grunde liegenden, oft komplizierten Regulationsmechanismen zu untersuchen und zu identifizieren, die für das Zustandekommen der zelltypspezifischen Expressionsmuster verantwortlich sind.

4.3 KHK und HI: komplexe Phänotypen – komplexe Mechanismen

Die Ätiologie von KHK und HI ist sehr komplex und multifaktoriell, so dass im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen zum einen mehrere genetische Varianten und zum anderen auch andere Faktoren wie Umwelteinflüsse eine Rolle bei der Entstehung spielen. Zudem sind viele der Risikofaktoren für KHK wie Diabetes, Hypertonie und Hyperlipidämie ebenfalls durch genetische Komponenten beeinflusst und nicht nur additive Interaktionseffekte

zwischen einzelnen Risikofaktoren bringen eine weitere Ebene der Komplexität ein (Lusis *et al.*, 2004). So tragen insgesamt wohl hunderte von Genen zu der Suszeptibilität für KHK beteiligt bei. Neben genetischen Varianten können dabei auch veränderte Expressionsspiegel einzelner Gene oder Exons Auswirkungen haben. Sehr vielschichtige Möglichkeiten bietet das alternative Spleißen, dessen Folge differenziell exprimierte Exons sind. In Makrophagen von gesunden Probanden und von HI-Patienten konnte unterschiedlich starke Expression verschiedener Exons von *TNF* beobachtet werden. Durch Behandlung der Zellen mit 9cRA-T0901317 bzw. IFN γ -LPS wurde die lange Isoform von *TNF* anders in ihrer Expression beeinflusst als die kurze. Es gibt bereits Belege für differenziell exprimierte Isoformen von *TNF* auf Proteinebene in Mausmakrophagen (Branch und Guilbert, 1996) und auch für humanes *TNF* wird das Vorkommen mehrerer Isoformen mit wahrscheinlich unterschiedlichen Funktionen vermutet (Muller *et al.*, 1986). Zwar konnten keine Unterschiede basierend auf dem 9p21.3 KHK Risiko-Haplotyp beobachtet werden, dennoch ist *TNF* stark in die Entwicklung von Atherosklerose involviert (Tedgui und Mallat, 2006) und somit könnte die Expression verschiedener Isoformen in Reaktion auf atherogene Stimulierung plausibel für die Beteiligung an der Vermittlung von Suszeptibilität für Atherosklerose und KHK sein. Es wurden viele weitere signifikant alternativ gespleißte Kandidatengene identifiziert, jedoch konnten meist keine übereinstimmenden annotierten Isoformen dazu beobachtet werden. Vielleicht deuten solche Ergebnisse zumindest teilweise auf das Vorkommen bisher unbekannter Transkripte hin, allerdings entsteht durch nicht-konservierte Spleißereignisse auch eine große Menge an „stochastischem Hintergrund“, also an Transkripten, die in niedriger Menge gebildet werden und keinerlei Bedeutung haben (Melamud und Moulton, 2009). Sehr interessant war die Identifizierung eines *Transcript Clusters*, dessen Detektionsbereich zwei Gene umfasst, die sowohl einzeln als auch als Fusionsprodukt transkribiert werden. Die Gene *LY75* (Lymphozyten-Antigen 75, auch *CD205* oder *CLEC13B* genannt) und *CD302* (auch *CLEC13A* oder *DCL1*) liegen in gleicher Transkriptionsrichtung auf Chromosom 2 direkt nebeneinander. In den Datenbanken ist bereits ein Eintrag für dieses *read-through* Fusionstranskript der beiden C-Typ Lektin-Rezeptoren vorhanden und seine Entstehung und Expression wurde in Zellen des Hodgkin-Lymphoms, die große Ähnlichkeiten zu Antigen-präsentierenden Zellen haben, ausführlich beschrieben (Kato *et al.*, 2003). In dendritischen Zellen konnte durch oxLDL eine erhöhte Expression des *Scavenger*-Rezeptors *LY75* beobachtet werden (Nickel *et al.*, 2009), für *CD302* ist eine Beteiligung in Endozytose/Phagozytose sowie Zelladhäsion und Migration beschrieben (Kato *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde in humanen Makrophagen eine Umkehr der Expressionsspiegel von *LY75* und *CD302* durch die Behandlung der Zellen mit IFN γ -LPS im Vergleich zum Grundzustand beobachtet. Durch Stimulierung mit 9cRA-

T0901317 wurde vermutlich eine hohe Expression des Fusionsprodukts ausgelöst, da über den gesamten Detektionsbereich der Sonden ein gleichbleibend hohes Expressionsniveau zu sehen war. Die Beteiligung der beiden einzelnen Proteine an der Aufnahme von oxLDL und anderen zu phagozytierenden Substanzen sowie an Zelladhäsion und Migration passt gut in den Verlauf der Atherosklerose. In der Fusions-mRNA liegen beide Gene in ihrem Leserahmen vor, jedoch fehlt dem entstehenden Fusionsprotein die zytoplasmatische Domäne von LY75, weshalb durch Bindung des Liganden für LY75 an das Fusionsprotein vermutlich eine andere Signaltransduktion vermittelt wird als bei Bindung an das einzelne Protein (Kato *et al.*, 2003). Die gemeinsame Transkription von zwei Genen in eine mRNA wurde auch unter der Bezeichnung „conjoined genes“ beschrieben und ist keine Seltenheit im humanen Genom (Prakash *et al.*, 2010). Es handelt sich dabei nicht einfach nur um Transkriptionsartefakte, sondern vielmehr um eine Anpassungsmöglichkeit an neue Anforderungen durch Erzeugung einer großen Vielfalt an mRNAs sowie Proteinen und stellt außerdem eine Ebene der Genregulation dar. Beispielsweise kann die Expression der beiden ursprünglichen Gene verhindert werden, indem aus dem Fusionsprodukt ein neues Protein oder ein nicht-kodierendes Transkript gebildet wird. Oder es wird der Leserahmen von nur einem Gen verwendet, so dass das zweite in einem anderen Leserahmen translatiert wird oder als nicht-translatierter Bereich übrig bleibt (Prakash *et al.*, 2010). Auch für *CDKN2BAS* wurde ein Fusionstranskript mit *MTAP* beschrieben, das aus den ersten vier Exons von *MTAP* plus Exon 2 und 3 von *CDKN2BAS* (=ANRIL) besteht (Falchi *et al.*, 2009). Allerdings fehlen Bestätigungen dieser Variante sowie funktionelle Beschreibungen, ob die Bildung dieses Fusionstranskripts mögliche regulatorische Effekte beispielsweise auf die Expression eines der beiden fusionierten Gene hat.

Insgesamt stellen sich die Mechanismen zur Regulation der Genexpression in Eukaryoten als außerordentlich komplex dar. Trotz intensiver Untersuchungen und einiger bereits sehr detailliert aufgeklärter Regulationswege eröffnen sich immer wieder überraschende Perspektiven und neue Komponenten wie beispielsweise nicht-kodierende (nc) RNAs. Insbesondere lange nicht-kodierende (lnc) RNAs sind in den letzten Jahren in den Fokus gekommen, da mehr und mehr funktionelle und regulatorische Aufgaben dieser RNA-Spezies bekannt wurden (Mercer *et al.*, 2009). In Abbildung 30 sind einige Möglichkeiten dargestellt, wie lncRNAs regulatorische Funktionen ausüben können (Wilusz *et al.*, 2009).

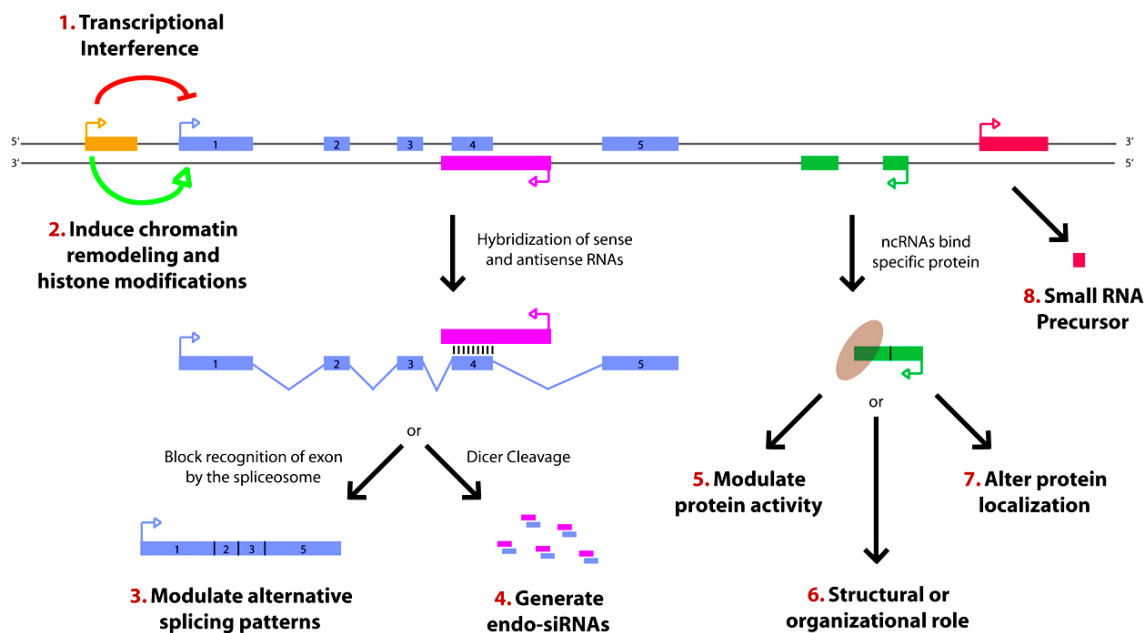


Abbildung 30: Mögliche regulatorische Funktionsweisen von lncRNAs.

LncRNAs können einfach durch die Tatsache ihrer eigenen Transkription benachbarte Gene indirekt beeinflussen, Auswirkung auf alternatives Spleißen zeigen oder Aktivität und Lokalisierung von Proteinen verändern (Wilusz *et al.*, 2009).

Beispielsweise kann durch Transkription von einem *upstream* gelegenen nicht-kodierenden Promotor (orange) die Expression eines *downstream* gelegenen Gens negativ (1) oder positiv (2) beeinflusst werden durch Verhindern der RNA-Polymerase II Bindung oder durch Induktion von Chromatin-Remodelling. Ein *antisense*-Transkript kann sich mit einem überlappenden *sense*-Transkript verbinden und so die Erkennung von Spleißstellen durch das Spleißosom verhindern und zu einem alternativen Spleißprodukt führen (3). Alternativ kann die Hybridisierung von *sense* und *antisense* Transkripten bewirken, dass die Endoribonuklease Dicer endogene siRNAs erzeugt (4). Durch Bindung an bestimmte Proteine kann ein nicht-kodierendes Transkript (grün) die Proteinaktivität abwandeln (5), als Strukturkomponente dienen (6) oder die Proteinlokalisierung in der Zelle ändern (7). LncRNAs (pink) können außerdem prozessiert werden zu kleineren RNAs wie miRNAs, piRNAs oder auch anderen, weniger gut charakterisierten kleinen Transkripten (8) (Wilusz *et al.*, 2009). Beispielsweise wurde für den humanen Dihydrofolat-Reduktase (*DHFR*)-Locus gezeigt, dass ein langes nicht-kodierendes Transkript, das aus dem Bereich *upstream* des Hauptpromotors von *DHFR* gebildet wird, die Expression des *downstream* gelegenen Protein-kodierenden Gens reprimiert (Martianov *et al.*, 2007). Interessanterweise kann diese ncRNA die Expression von *DHFR* sowohl in *cis* durch die Bildung einer RNA-DNA Triplex-Struktur mit dem *DHFR*-Promotor, als auch in *trans* durch direkte Interaktion mit dem

Transkriptionsfaktor TFIIB und der damit verbundenen Dissoziation des Präinitiationskomplexes vom Hauptpromotor hemmen. Die lncRNA HOTAIR (*HOX antisense intergenic RNA*) ist auf Chromosom 12 kodiert, kontrolliert jedoch die Genexpression auf Chromosom 2. Dieser *trans*-Effekt geschieht durch die Interaktion von HOTAIR mit dem PRC2 und der erzeugten repressiven Chromatin-Struktur durch H3K27me3 (Rinn *et al.*, 2007). Der Komplex PRC2 besteht aus der H3K27 Histonmethyltransferase EZH2, den Kernkomponenten SUZ12 und EED und ist für die Initiierung der Repression zuständig. PRC1 bindet über seine Chromodomäne der Polycomb/Chromobox (CBX) Komponente das methylierte Lysin und sorgt dann für die Aufrechterhaltung der Modifikation sowie die Monoubiquitinylierung von H2AK119 und fördert die Verdichtung des Chromatins (Sparmann und van Lohuizen, 2006). Auch wenn die Mechanismen der Polycomb-vermittelten Transkriptionsrepression gut untersucht sind, ist weniger klar, wie die Komplexe an die jeweiligen Gene rekrutiert werden. Für einige Komponenten der Polycomb-Komplexe wurden RNA-Bindeaktivitäten gezeigt und es wird postuliert, dass lncRNAs die Rekrutierung und Bindung der Komplexe an DNA vermitteln könnten (Wang und Chang, 2011). Auch für CDKN2BAS konnten Bindungen mit CBX7, einer Komponente des PRC1 (Yap *et al.*, 2010), sowie mit SUZ12, einer Komponente des PRC2, nachgewiesen werden (Kotake *et al.*, 2011). Unterbindung dieser Interaktionen hatte jeweils Auswirkungen auf die Repression des Ziel-Locus *INK4b-ARF-INK4a*. Daher wird für CDKN2BAS ähnlich wie für HOTAIR eine Funktion in der Transkriptionsregulation postuliert, die über Rekrutierung verschiedener Chromatin-modifizierender Komplexe abläuft. Allerdings muss die genaue Rolle von CDKN2BAS in dieser Regulation erst noch geklärt werden, um gegebenenfalls auch einen funktionellen Link zur Vermittlung des erhöhten KHK-Risikos durch den 9p21.3 Locus herstellen zu können. Für die bisher untersuchten lncRNAs wurden sowohl *cis*- als auch *trans*-Effekte in der Transkriptionsregulation gezeigt. Da der Einfluss von *CDKN2BAS* auf die Nachbargene auf Chromosom 9p21.3 noch nicht zu einem einheitlichen Bild geführt hat, könnte auch ein *trans*-Effekt auf andere Gene möglich sein. In HeLa-Zellen wurden durch Überexpression von CDKN2BAS verschiedene Gene in *trans* beeinflusst (Sato *et al.*, 2010). Insgesamt gibt es vielfältige Möglichkeiten, wie lncRNAs die Regulation von Genen beeinflussen können (siehe Abbildung 30) und gerade für die Vermittlung des genetischen Effekts auf die erhöhte Suszeptibilität für KHK und HI könnte dem Risiko-Locus auf Chromosom 9p21.3 ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen als bisher vermutet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die lange nicht-kodierende RNA CDKN2BAS in kleinere RNAs prozessiert wird und so wiederum eine Vielfalt an Genen reguliert. Da in der Microarray-Untersuchung einige auf Basis des 9p21.3 Haplotyps unterschiedlich exprimierte oder regulierte Gene beobachtet werden konnten, bleibt zu untersuchen, ob es einen oder wenige gemeinsame Mechanismen

gibt, durch die diese Effekte zustande kommen. Möglicherweise kann die lncRNA des 9p21.3 Locus durch mehrere Funktionsweisen die Genregulation beeinflussen und so sowohl Interleukine wie auch Metallothioneine oder *CCL8* als Zielgene regulieren. Da die genaue Funktion von *CDKN2BAS* trotz intensiver Untersuchungen noch nicht aufgeklärt werden konnte, ist umso weniger klar, ob überhaupt diese lncRNA für die Vermittlung des genetischen Effekts des KHK Risiko-Locus verantwortlich ist. Es wäre möglich, dass das Risiko für KHK und HI durch einen bisher unbekannten, komplett neuen Mechanismus beeinflusst wird. Zudem wurde der 9p21.3-Locus als einer der meist pleiotropen Loci beschrieben und ist mit insgesamt 20 Phänotypen signifikant assoziiert (Maouche und Schunkert, 2012). Das lässt vermuten, dass die Mechanismen, die Krankheiten zu Grunde liegen, oft viel komplexer sind als anfänglich gedacht. Allerdings könnte dieser Pleiotropismus auch hilfreich sein beim Verständnis mancher Mechanismen, die in verschiedenen Krankheitsprozessen gleich sind. Es wäre auch denkbar, dass neben Gemeinsamkeiten gewisse Verschiedenheiten hilfreich für die Aufklärung der zu Grunde liegenden zellulären Effekte sein könnten. In dieser Arbeit wurden beispielsweise mehr Genexpressionsunterschiede zwischen den 9p21.3 Haplotyp-Gruppen in HI-Patienten detektiert, die so bei den gesunden Probanden nicht beobachtet wurden. Das könnte daran liegen, dass die *Power* in der Gruppe mit 40 Herzinfarkt-Patienten größer war im Vergleich zu den 28 gesunden Probanden. Außerdem könnten die Effekte, die nur in den HI-Patienten zu sehen waren, durch Unterschiede in nicht-genetischen Faktoren wie Lebensweise oder Medikation bedingt sein. Ebenso kann es sich natürlich auch um einen wirklichen biologischen Effekt handeln, der die krankheitsverursachenden Wege in den HI-Patienten widerspiegelt. Genauerer Nachforschungen bedürfen auch solche Beobachtungen, bei denen ein Gen zwar in beiden Kohorten eine Expressionsänderung aufwies, diese aber in gegensätzliche Richtungen gingen. Auch dabei kann es sich um spezifische Effekte handeln oder aber um Artefakte oder Nebeneffekte von anderen, nicht kontrollierbaren Einflussfaktoren. Fokussiert auf Genexpressionsunterschiede zwischen den 9p21.3 Haplotypen wurden in dieser Arbeit nach Standardprotokollen isolierte Zellen betrachtet, ohne diese genauer bezüglich ihrer Subpopulationen zu charakterisieren. Es ist eine große Heterogenität von Monozyten und Makrophagen beschrieben, deren physiologische Relevanz noch nicht ins Detail verstanden ist (Gordon und Taylor, 2005). In atherosklerotischen *ApoE-Knockout*-Mäusen wurde gezeigt, dass durch Hypercholesterinämie (Swirski *et al.*, 2007) sowie nach einem Herzinfarkt (Dutta *et al.*, 2012) insbesondere die Zahl der inflammatorischen Monozyten-Subpopulation $Ly-6C^{high}$ angestiegen ist. Diese Zellen entsprechen den humanen $CD14^{high}CD16^{-}$ Monozyten, die zu atherosklerotischen Läsionen rekrutiert werden und dort zu Makrophagen differenzieren,

welche durch klassische Aktivierung über IFN γ und LPS pro-inflammatorische Zytokine freisetzen und die Entzündung vorantreiben (Gui *et al.*, 2012). Aus Ly6^{low} differenzierte Makrophagen werden dagegen alternativ aktiviert durch IL4 oder IL13 und haben Zellproliferation und Geweberegenerierung zur Folge. Trotz dieser Klassifikationen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Zellen in einer inflammatorischen Umgebung verschiedenen Stimuli ausgesetzt werden und es dadurch zu komplexen phänotypischen Konsequenzen kommt (Gordon und Taylor, 2005).

In dieser Arbeit wurden im humanen Makrophagen-Modell mehrere Gene/*Pathways* identifiziert, deren Verständnis in der Pathophysiologie in Zukunft ein besseres Verstehen des 9p21.3-vermittelten KHK-Risikos erlaubt.

4.4 Ausblick

Die Sequenzierung des humanen Genoms sorgte für eine Überraschung, als festgestellt wurde, dass es nur etwa 20.000 bis 25.000 Protein-kodierende Gene gibt, die weniger als 2 % der gesamten genomischen Sequenz darstellen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Dennoch werden wahrscheinlich mehr als 90 % des Genoms transkribiert (Birney *et al.*, 2007), was zu einer extrem großen Anzahl und Vielfalt an nicht-kodierenden Transkripten wie langen RNAs führt. Die meisten der in GWAS identifizierten SNPs, die Assoziationen mit den jeweiligen Phänotypen zeigen, liegen in nicht-kodierenden Bereichen, so dass die molekularen Mechanismen meist nicht offensichtlich sind und man davon ausgeht, dass das nächstgelegene Gen den Effekt vermitteln könnte. Die Tatsache, dass fast das gesamte Genom transkribiert wird und viele nicht-kodierende Transkripte entstehen, eröffnet ein neues Spektrum an Strategien, wie die Assoziationseffekte auf zellulärer Ebene vermittelt werden können. Hinzu kommt das verflochtene Netzwerk aus Genom, Epigenom, Transkriptom, Proteom und Metabolom, das in allen Bereichen noch durch Umweltfaktoren beeinflusst werden kann und schließlich zur Entstehung von komplexen kardiovaskulären Phänotypen führt (Schnabel *et al.*, 2012). Die Beobachtungen im Transkriptom und Epigenom von humanen Monozyten/Makrophagen stratifiziert nach dem 9p21.3 KHK Risiko-Haplotyp bilden ein kleines Puzzlestück in dem komplexen Netzwerk und es bleibt zu klären, wie diese zustande kommen und welche Konsequenzen davon erwartet werden können. Neben hochdichten Microarrays ermöglichen weitere neue Hochdurchsatz-Technologien in diesen Gebieten eine weitreichende Erfassung des zellulären Geschehens und bieten so vielversprechende Wege, die noch fehlenden

Mechanismen in der Ausbildung von kardiovaskulären Krankheiten bis ins Detail zu verstehen. Dadurch könnte in Zukunft eine effektivere Prävention möglich sein, wohl weniger durch die Kenntnis von genetischen Loci, die mit erhöhtem Risiko assoziiert sind, da diese meist nur kleine Beiträge zur Suszeptibilität haben, als vielmehr durch das gewonnene Verständnis der genauen Abläufe der Erkrankungen auf zellulärer Ebene.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der bekannte Risiko-Locus auf Chromosom 9p21.3 hinsichtlich seiner Rolle in Atherosklerose und KHK/HI untersucht. Unterschiede in der Genexpression können Einblicke in die Funktion genomischer Regionen geben, die mit einer Krankheit assoziiert sind. Mit Hilfe von Microarrays wurde die genomweite Genexpression von Makrophagen aus gesunden Probanden und HI-Patienten stratifiziert nach 9p21.3 Haplotypen sowohl im Grundzustand als auch nach atherogener Stimulierung erhoben und auf differenziell exprimierte Gene zwischen den Haplotyp-Gruppen hin untersucht.

CCL8 zeigte in Makrophagen im Grundzustand wie auch durch Stimulierung mit 9cRA-T0901317 und IFN γ -LPS unterschiedliche Expression und Regulation in Abhängigkeit des 9p21.3 KHK Risiko-Locus. Außerdem wurden unterschiedlich starke Expressionsänderungen von Metallothioninen und Interleukinen durch pro-inflammatorische Stimulierung der Zellen mit IFN γ -LPS in Trägern des Risiko-Allels im Vergleich zu den nicht-risiko Gruppen beobachtet. Lipid-Stimulierung mit 9cRA-T0901317 führte in Makrophagen von HI-Patienten homozygot für den Risiko-Haplotyp zu geringerer Herunterregulation von Genen, die im Zusammenhang mit Zellzyklus und Proliferation stehen. Es wäre möglich, dass die lange nicht-kodierende RNA *CDKN2BAS*, die auf Chromosom 9p21.3 kodiert ist, eine regulatorische Funktion ausübt und so durch Einfluss auf die Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit des 9p21.3 KHK Risiko-Locus den zellulären Effekt des Befundes aus genomweiten Assoziationsstudien vermittelt.

Für die Expression der Gene auf Chromosom 9p21.3 konnte für alternative Spleißformen von *CDKN2BAS* eine Abhängigkeit vom Risiko-Locus beobachtet werden. In Monozyten wurde ein alternatives 5'-Ende mit deutlich mehr Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Vergleich zur annotierten Sequenz gefunden. Ein CpG direkt neben der Bindestelle für den Transkriptionsfaktor STAT1 in einem *Enhancer* auf Chromosom 9p21.3 war in Trägern des nicht-risiko Haplotyps signifikant stärker methyliert als in Trägern des Risiko-Haplotyps.

Der Mechanismus, über den der Effekt des 9p21.3 Risiko-Locus auf zellulärer Ebene vermittelt wird, scheint ein komplexes Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Einflüsse auf den 9p21.3 Locus sowie auf die genomweite Genexpression zu sein. Eine systematische Analyse der Expression und Regulation der 9p21.3 Region sowie das Verständnis in der Pathophysiologie der im Makrophagen-Modell identifizierten Gene/*Pathways* wird in Zukunft ein besseres Verstehen des 9p21.3-vermittelten KHK-Risikos erlauben.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilo, F., Zhou, M. M., Walsh, M. J. (2011). Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer Res.* **71**, 5365-5369.
- Aiello, R. J., Bourassa, P. A., Lindsey, S., Weng, W., Natoli, E., Rollins, B. J., Milos, P. M. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1518-1525.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van, D., V, Zeller, S. *et al.* (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 701-721.
- Allenby, G., Bocquel, M. T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J. F., Chambon, P., . (1993). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 30-34.
- Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S., Evans, R. M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* **298**, 240-244.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 675-705.
- Batliner, J., Mancarelli, M. M., Jenal, M., Reddy, V. A., Fey, M. F., Torbett, B. E., Tschan, M. P. (2011). CLEC5A (MDL-1) is a novel PU.1 transcriptional target during myeloid differentiation. *Mol. Immunol.* **48**, 714-719.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003). Biochemie. (Berlin: *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*), pp. 877-887.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G. P., Gunderson, K. L., Fan, J. B., Shen, R. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* **98**, 288-295.
- Bird, A. P. (1987). CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends in Genetics* **3**, 342-347.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S. *et al.* (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799-816.
- Bishop, D. T., Demenais, F., Iles, M. M., Harland, M., Taylor, J. C., Corda, E., Randerson-Moor, J., Aitken, J. F., Avril, M. F., Azizi, E., Bakker, B., Bianchi-Scarra, G., Bressac-de, P. B., Calista, D., Cannon-Albright, L. A. *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat. Genet.* **41**, 920-925.
- Bjorkhem, I. (1992). Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J. Lipid Res.* **33**, 455-471.

- Boisvert, W. A. (2004). Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc. Med.* **14**, 161-165.
- Branch, D. R., Guilbert, L. J. (1996). Differential expression of tumor necrosis factor- α isoforms from lipopolysaccharide- and cytokine-stimulated mouse macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 949-955.
- Braunersreuther, V., Mach, F., Steffens, S. (2007). The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **97**, 714-721.
- Broadbent, H. M., Peden, J. F., Lorkowski, S., Goel, A., Ongen, H., Green, F., Clarke, R., Collins, R., Franzosi, M. G., Tognoni, G., Seedorf, U., Rust, S., Eriksson, P., Hamsten, A., Farrall, M. *et al.* (2008). Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 806-814.
- Broeckel, U., Hengstenberg, C., Mayer, B., Holmer, S., Martin, L. J., Comuzzie, A. G., Blangero, J., Nurnberg, P., Reis, A., Riegger, G. A., Jacob, H. J., Schunkert, H. (2002). A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat. Genet.* **30**, 210-214.
- Burd, C. E., Jeck, W. R., Liu, Y., Sanoff, H. K., Wang, Z., Sharpless, N. E. (2010). Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS. Genet.* **6**, e1001233.
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engstrom, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R. *et al.* (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* **38**, 626-635.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* **21**, 2933-2942.
- Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X. C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D. J., Morris, M. S., Fodor, S. P. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* **274**, 610-614.
- Claudel, T., Leibowitz, M. D., Fievet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J. J., Torpier, G., Lobaccaro, J. M., Paterniti, J. R., Mangelsdorf, D. J., Heyman, R. A., Auwerx, J. (2001). Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 2610-2615.
- Congrains, A., Kamide, K., Katsuya, T., Yasuda, O., Oguro, R., Yamamoto, K., Ohishi, M., Rakugi, H. (2012). CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**, 612-616.
- Costet, P., Lallanne, F., Gerbod-Giannone, M. C., Molina, J. R., Fu, X., Lund, E. G., Gudas, L. J., Tall, A. R. (2003). Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7756-7766.
- Cunnington, M. S., Santibanez, K. M., Mayosi, B. M., Burn, J., Keavney, B. (2010). Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS. Genet.* **6**, e1000899.

Deaton, A. M., Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010-1022.

Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, 3.

Do, R., Xie, C., Zhang, X., Mannisto, S., Harald, K., Islam, S., Bailey, S. D., Rangarajan, S., McQueen, M. J., Diaz, R., Lisheng, L., Wang, X., Silander, K., Peltonen, L., Yusuf, S. *et al.* (2011). The effect of chromosome 9p21 variants on cardiovascular disease may be modified by dietary intake: evidence from a case/control and a prospective study. *PLoS. Med.* **8**, e1001106.

Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbato, R., Robbins, C. S., Iwamoto, Y., Thompson, B., Carlson, A. L., Heidt, T., Majmudar, M. D., Lasitschka, F., Etzrodt, M., Waterman, P., Waring, M. T. *et al.* (2012). Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* **487**, 325-329.

Eisenhart, C. (1947). The assumptions underlying the analysis of variance. *Biometrics* **3**, 1-21.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I. R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes. Infect.* **4**, 837-851.

Falchi, M., Bataille, V., Hayward, N. K., Duffy, D. L., Bishop, J. A., Pastinen, T., Cervino, A., Zhao, Z. Z., Deloukas, P., Soranzo, N., Elder, D. E., Barrett, J. H., Martin, N. G., Bishop, D. T., Montgomery, G. W. *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi. *Nat. Genet.* **41**, 915-919.

Faustino, N. A., Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**, 419-437.

Fenk, S. Stimulation von Monozyten mit LPS/IFN γ und Glukose/Palmitinsäure: Expressionsstudie an Herzinfarktpatienten mit definierten Haplotypen auf Chromosom 9p21. 2011.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Fischer, M., Broeckel, U., Holmer, S., Baessler, A., Hengstenberg, C., Mayer, B., Erdmann, J., Klein, G., Riegger, G., Jacob, H. J., Schunkert, H. (2005). Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation* **111**, 855-862.

Folkersen, L., Kyriakou, T., Goel, A., Peden, J., Malarstig, A., Paulsson-Berne, G., Hamsten, A., Hugh, W., Franco-Cereceda, A., Gabrielsen, A., Eriksson, P. (2009). Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS. One.* **4**, e7677.

Friedlander, Y., Siscovick, D. S., Weinmann, S., Austin, M. A., Psaty, B. M., Lemaitre, R. N., Arbogast, P., Raghunathan, T. E., Cobb, L. A. (1998). Family history as a risk factor for primary cardiac arrest. *Circulation* **97**, 155-160.

Gil, J., Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667-677.

Glass, C. K., Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503-516.

Gonzalez-Navarro, H., Abu Nabah, Y. N., Vinue, A., Andres-Manzano, M. J., Collado, M., Serrano, M., Andres, V. (2010). p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 2258-2268.

Gordon, S., Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953-964.

Gschwendtner, A., Bevan, S., Cole, J. W., Plourde, A., Matarin, M., Ross-Adams, H., Meitinger, T., Wichmann, E., Mitchell, B. D., Furie, K., Slowik, A., Rich, S. S., Syme, P. D., MacLeod, M. J., Meschia, J. F. *et al.* (2009). Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann. Neurol.* **65**, 531-539.

Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T., Muragaki, Y. (2012). Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators of Inflammation* **2012**.

Hamilton, T. A., Adams, D. O. (1987). Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunology Today* **8**, 151-158.

Hansson, G. K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1876-1890.

Hansson, G. K. (2009). Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* **7 Suppl 1**, 328-331.

Hansson, G. K., Robertson, A. K., Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 297-329.

Harismendy, O., Notani, D., Song, X., Rahim, N. G., Tanasa, B., Heintzman, N., Ren, B., Fu, X. D., Topol, E. J., Rosenfeld, M. G., Frazer, K. A. (2011). 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature* **470**, 264-268.

Hartvigsen, K., Chou, M. Y., Hansen, L. F., Shaw, P. X., Tsimikas, S., Binder, C. J., Witztum, J. L. (2009). The role of innate immunity in atherogenesis. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S388-S393.

Heby, O. (1981). Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* **19**, 1-20.

Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Magnusson, K. P., Gretarsdottir, S., Steinthorsdottir, V., Manolescu, A., Jones, G. T., Rinkel, G. J., Blankensteijn, J. D., Ronkainen, A., Jaaskelainen, J. E., Kyo, Y., Lenk, G. M., Sakalihasan, N., Kostulas, K. *et al.* (2008). The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat. Genet.* **40**, 217-224.

Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Gretarsdottir, S., Blondal, T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Baker, A., Palsson, A., Masson, G., Gudbjartsson, D. F., Magnusson, K. P., Andersen, K., Levey, A. I. *et al.* (2007). A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* **316**, 1491-1493.

- Hirai, H., Sherr, C. J. (1996). Interaction of D-type cyclins with a novel myb-like transcription factor, DMP1. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6457-6467.
- Hochberg, Y., Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat. Med.* **9**, 811-818.
- Höcherl, R. Haplotyp-spezifische Expressionsanalyse des Herzinfarkt-Locus auf Chromosom 9p21.3 anhand des Vergleichs der Stimulation von peripheren mononukleären Zellen mit Lipopolysaccharid und Interferon γ sowie 9-cis Retinsäure und T0901317. 2011.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Holdt, L. M., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gabel, G., Bergert, H., Schuler, G., Thiery, J., Teupser, D. (2010). ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 620-627.
- Holdt, L. M., Sass, K., Gabel, G., Bergert, H., Thiery, J., Teupser, D. (2011). Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15(INK4b)), CDKN2A (p16(INK4a), p14(ARF)) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* **214**, 264-270.
- Holdt, L. M., Teupser, D. (2012). Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 196-206.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 7276-7280.
- Huang, d. W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1-13.
- Huang, d. W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44-57.
- Illingworth, R. S., Bird, A. P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* **583**, 1713-1720.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945.
- Ivanchuk, S. M., Mondal, S., Dirks, P. B., Rutka, J. T. (2001). The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J. Neurooncol.* **51**, 219-229.
- Jarinova, O., Stewart, A. F., Roberts, R., Wells, G., Lau, P., Naing, T., Buerki, C., McLean, B. W., Cook, R. C., Parker, J. S., McPherson, R. (2009). Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1671-1677.
- Kalsotra, A., Cooper, T. A. (2011). Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 715-729.

- Kane, A. J., Sughrue, M. E., Rutkowski, M. J., Phillips, J. J., Parsa, A. T. (2010). EMR-3: a potential mediator of invasive phenotypic variation in glioblastoma and novel therapeutic target. *Neuroreport* **21**, 1018-1022.
- Kato, M., Khan, S., d'Aniello, E., McDonald, K. J., Hart, D. N. (2007). The novel endocytic and phagocytic C-Type lectin receptor DCL-1/CD302 on macrophages is colocalized with F-actin, suggesting a role in cell adhesion and migration. *J. Immunol.* **179**, 6052-6063.
- Kato, M., Khan, S., Gonzalez, N., O'Neill, B. P., McDonald, K. J., Cooper, B. J., Angel, N. Z., Hart, D. N. (2003). Hodgkin's lymphoma cell lines express a fusion protein encoded by intergenically spliced mRNA for the multilectin receptor DEC-205 (CD205) and a novel C-type lectin receptor DCL-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 34035-34041.
- Keren, H., Lev-Maor, G., Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 345-355.
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., Xiong, Y. (2011). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* **30**, 1956-1962.
- Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., Klimasauskas, S. (2012). 5-Hydroxymethylcytosine - the elusive epigenetic mark in mammalian DNA. *Chem. Soc. Rev.*
- Langmann, T., Liebisch, G., Moehle, C., Schifferer, R., Dayoub, R., Heiduczek, S., Grandl, M., Dada, A., Schmitz, G. (2005). Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 155-161.
- Lawn, R. M., Wade, D. P., Garvin, M. R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J. G., Seilhamer, J. J., Vaughan, A. M., Oram, J. F. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest* **104**, R25-R31.
- Lazaruk, K., Wang, Y., Zhong, J., Maltchenko, S., Rabkin, S., Hunkapiller, K., Furtado, M., Petrauskene, O., Guegler, K., Gilbert, D., Spier, E. (2006). The Design Process for a New Generation of Quantitative Gene Expression Analysis Tools. *Applied Biosystems*.
- Leander, K., Hallqvist, J., Reuterwall, C., Ahlbom, A., de, F. U. (2001). Family history of coronary heart disease, a strong risk factor for myocardial infarction interacting with other cardiovascular risk factors: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Epidemiology* **12**, 215-221.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.
- Libby, P. (2006). Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 456S-460S.
- Licatalosi, D. D., Darnell, R. B. (2010). RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 75-87.
- Litovchick, L., Sadasivam, S., Florens, L., Zhu, X., Swanson, S. K., Velmurugan, S., Chen, R., Washburn, M. P., Liu, X. S., DeCaprio, J. A. (2007). Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol. Cell* **26**, 539-551.

- Liu, Y., Sanoff, H. K., Cho, H., Burd, C. E., Torrice, C., Mohlke, K. L., Ibrahim, J. G., Thomas, N. E., Sharpless, N. E. (2009). INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS. One.* **4**, e5027.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**, 357-362.
- Lloyd-Jones, D. M., Nam, B. H., D'Agostino, R. B., Sr., Levy, D., Murabito, J. M., Wang, T. J., Wilson, P. W., O'Donnell, C. J. (2004). Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA* **291**, 2204-2211.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1675-1680.
- Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T., Murray, C. J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**, 1747-1757.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241.
- Lusis, A. J., Mar, R., Pajukanta, P. (2004). Genetics of atherosclerosis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 189-218.
- Maier, J. A., Statuto, M., Ragnotti, G. (1993). Senescence stimulates U937-endothelial cell interactions. *Exp. Cell Res.* **208**, 270-274.
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., Cho, J. H., Guttmacher, A. E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E. *et al.* (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747-753.
- Maouche, S., Schunkert, H. (2012). Strategies beyond genome-wide association studies for atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 170-181.
- Marenberg, M. E., Risch, N., Berkman, L. F., Floderus, B., de, F. U. (1994). Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1041-1046.
- Margueron, R., Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343-349.
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra, B. A., Chow, N., Akoulitchiev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* **445**, 666-670.
- Mazer, S. P., Rabbani, L. E. (2004). Evidence for C-reactive protein's role in (CRP) vascular disease: atherothrombosis, immuno-regulation and CRP. *J. Thromb. Thrombolysis.* **17**, 95-105.
- McLaren, J. E., Ramji, D. P. (2009). Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 125-135.

- McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., Stewart, A., Roberts, R., Cox, D. R., Hinds, D. A., Pennacchio, L. A., Tybjaerg-Hansen, A., Folsom, A. R., Boerwinkle, E., Hobbs, H. H., Cohen, J. C. (2007). A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* **316**, 1488-1491.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**, 766-770.
- Melamud, E., Moul, J. (2009). Stochastic noise in splicing machinery. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4873-4886.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155-159.
- Miyake, Y., Ishikawa, E., Ishikawa, T., Yamasaki, S. (2010). Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle. *Self Nonself.* **1**, 310-313.
- Monczak, Y., Trudel, M., Lamph, W. W., Miller, W. H., Jr. (1997). Induction of apoptosis without differentiation by retinoic acid in PLB-985 cells requires the activation of both RAR and RXR. *Blood* **90**, 3345-3355.
- Motterle, A., Pu, X., Wood, H., Xiao, Q., Gor, S., Liang, N. F., Chan, K., Cross, F., Shohreh, B., Poston, R. N., Tucker, A. T., Caulfield, M. J., Ye, S. (2012). Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Hum. Mol. Genet.*
- Muhl, H., Pfeilschifter, J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 1247-1255.
- Mukherjee, R., Davies, P. J., Crombie, D. L., Bischoff, E. D., Cesario, R. M., Jow, L., Hamann, L. G., Boehm, M. F., Mondon, C. E., Nadzan, A. M., Paterniti, J. R., Jr., Heyman, R. A. (1997). Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* **386**, 407-410.
- Mullenix, P. S., Andersen, C. A., Starnes, B. W. (2005). Atherosclerosis as inflammation. *Ann. Vasc. Surg.* **19**, 130-138.
- Muller, R., Marmenout, A., Fiers, W. (1986). Synthesis and maturation of recombinant human tumor necrosis factor in eukaryotic systems. *FEBS Lett.* **197**, 99-104.
- Murabito, J. M., Pencina, M. J., Nam, B. H., D'Agostino, R. B., Sr., Wang, T. J., Lloyd-Jones, D., Wilson, P. W., O'Donnell, C. J. (2005). Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA* **294**, 3117-3123.
- Murphy, T. L., Cleveland, M. G., Kulesza, P., Magram, J., Murphy, K. M. (1995). Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5258-5267.
- Nath, R., Kumar, D., Li, T., Singal, P. K. (2000). Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular system. *Toxicology* **155**, 17-26.

- Nathan, L., Chaudhuri, G. (1997). Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 477-515.
- Nickel, T., Schmauss, D., Hanssen, H., Sicic, Z., Krebs, B., Jankl, S., Summo, C., Fraunberger, P., Walli, A. K., Pfeiler, S., Weis, M. (2009). oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation. *Atherosclerosis* **205**, 442-450.
- Ostuni, R., Zanoni, I., Granucci, F. (2010). Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 4109-4134.
- Ounpuu, S., Negassa, A., Yusuf, S. (2001). INTER-HEART: A global study of risk factors for acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* **141**, 711-721.
- Ozsolak, F., Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 87-98.
- Palomaki, G. E., Melillo, S., Bradley, L. A. (2010). Association between 9p21 genomic markers and heart disease: a meta-analysis. *JAMA* **303**, 648-656.
- Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res.* **67**, 3963-3969.
- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., Fodor, S. P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 5022-5026.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Pilbrow, A. P., Folkersen, L., Pearson, J. F., Brown, C. M., McNoe, L., Wang, N. M., Sweet, W. E., Tang, W. H., Black, M. A., Troughton, R. W., Richards, A. M., Franco-Cereceda, A., Gabrielsen, A., Eriksson, P., Moravec, C. S. *et al.* (2012). The chromosome 9p21.3 coronary heart disease risk allele is associated with altered gene expression in normal heart and vascular tissues. *PLoS. One.* **7**, e39574.
- Prakash, T., Sharma, V. K., Adati, N., Ozawa, R., Kumar, N., Nishida, Y., Fujikake, T., Takeda, T., Taylor, T. D. (2010). Expression of conjoined genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes. *PLoS. One.* **5**, e13284.
- Proost, P., Wuyts, A., van, D. J. (1996). Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 67-74.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T. L., Wilson, C. J., Bell, S. P., Young, R. A. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**, 2306-2309.

Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311-1323.

Rivard, A., Andres, V. (2000). Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol. Histopathol.* **15**, 557-571.

Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J. *et al.* (2012). Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **125**, e2-e220.

Rosenfeld, M. E., Ross, R. (1990). Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **10**, 680-687.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126.

Samani, N. J., Deloukas, P., Erdmann, J., Hengstenberg, C., Kuulasmaa, K., McGinnis, R., Schunkert, H., Soranzo, N., Thompson, J., Tiret, L., Ziegler, A. (2009). Large scale association analysis of novel genetic loci for coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 774-780.

Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R. J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H. E., Barrett, J. H., Konig, I. R., Stevens, S. E., Szymczak, S., Tregouet, D. A. *et al.* (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 443-453.

Sato, K., Nakagawa, H., Tajima, A., Yoshida, K., Inoue, I. (2010). ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncol. Rep.* **24**, 701-707.

Savarese, T. M., Crabtree, G. W., Parks, R. E., Jr. (1981). 5'-Methylthioadenosine phosphorylase-L. Substrate activity of 5'-deoxyadenosine with the enzyme from Sarcoma 180 cells. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 189-199.

Schaefer, A. S., Richter, G. M., Groessner-Schreiber, B., Noack, B., Nothnagel, M., El Mokhtari, N. E., Loos, B. G., Jepsen, S., Schreiber, S. (2009). Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS. Genet.* **5**, e1000378.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.

Schleithoff, C., Voelter-Mahlknecht, S., Dahmke, I. N., Mahlke, U. (2012). On the epigenetics of vascular regulation and disease. *Clin. Epigenetics.* **4**, 7.

Schnabel, R. B., Baccarelli, A., Lin, H., Ellinor, P. T., Benjamin, E. J. (2012). Next steps in cardiovascular disease genomic research--sequencing, epigenetics, and transcriptomics. *Clin. Chem.* **58**, 113-126.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163-189.

Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831-2838.

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429-1431.

Schunkert, H., Gotz, A., Braund, P., McGinnis, R., Tregouet, D. A., Mangino, M., Linsel-Nitschke, P., Cambien, F., Hengstenberg, C., Stark, K., Blankenberg, S., Tiret, L., Ducimetiere, P., Keniry, A., Ghoris, M. J. *et al.* (2008). Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* **117**, 1675-1684.

Shibata, N., Glass, C. K. (2010). Macrophages, oxysterols and atherosclerosis. *Circ. J.* **74**, 2045-2051.

Sparmann, A., van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 846-856.

Stacey, M., Lin, H. H., Hilyard, K. L., Gordon, S., McKnight, A. J. (2001). Human epidermal growth factor (EGF) module-containing mucin-like hormone receptor 3 is a new member of the EGF-TM7 family that recognizes a ligand on human macrophages and activated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **276**, 18863-18870.

Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., Pittet, M. J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest* **117**, 195-205.

Tamhane, A. C. und Dunlop, D. D. (2000). Statistics and Data Analysis from Elementary to Intermediate. (New Jersey: *Prentice Hall*), pp. 473-474.

Tedgui, A., Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* **86**, 515-581.

Terasaka, N., Hiroshima, A., Koieyama, T., Ubukata, N., Morikawa, Y., Nakai, D., Inaba, T. (2003). T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett.* **536**, 6-11.

The Wellcome Trust Case Control Consortium (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-678.

Thomas, T., Thomas, T. J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 244-258.

Thompson, W. A. (1962). The problem of negative estimates of variance components. *Ann. Math. Statist.* **33**, 273-289.

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. *et al.* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-536.

- van Boxel-Dezaire, A. H., Stark, G. R. (2007). Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **316**, 119-154.
- Visel, A., Zhu, Y., May, D., Afzal, V., Gong, E., Attanasio, C., Blow, M. J., Cohen, J. C., Rubin, E. M., Pennacchio, L. A. (2010). Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* **464**, 409-412.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E. *et al.* (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* **280**, 1077-1082.
- Wang, K. C., Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* **43**, 904-914.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* **23**, 1494-1504.
- Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Horoszewicz, K., Beltowski, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online.)* **61**, 736-759.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433.
- Wuttge, D. M., Romert, A., Eriksson, U., Torma, H., Hansson, G. K., Sirsjo, A. (2001). Induction of CD36 by all-trans retinoic acid: retinoic acid receptor signaling in the pathogenesis of atherosclerosis. *FASEB J.* **15**, 1221-1223.
- Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell* **137**, 13-17.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* **10**, 678-684.
- Yan, M. S., Matouk, C. C., Marsden, P. A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *J. Appl. Physiol* **109**, 916-926.
- Yap, K. L., Li, S., Munoz-Cabello, A. M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M. J., Zhou, M. M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* **38**, 662-674.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**, 937-952.
- Zanotti, I., Poti, F., Pedrelli, M., Favari, E., Moleri, E., Franceschini, G., Calabresi, L., Bernini, F. (2008). The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J. Lipid Res.* **49**, 954-960.

Zdravkovic, S., Wienke, A., Pedersen, N. L., Marenberg, M. E., Yashin, A. I., de, F. U. (2002). Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J. Intern. Med.* **252**, 247-254.

Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., Timpson, N. J., Perry, J. R., Rayner, N. W., Freathy, R. M., Barrett, J. C., Shields, B., Morris, A. P., Ellard, S., Groves, C. J. *et al.* (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* **316**, 1336-1341.

Zeller, T., Blankenberg, S., Diemert, P. (2012). Genomewide association studies in cardiovascular disease--an update 2011. *Clin. Chem.* **58**, 92-103.

7 Anhang

Tabelle 18: Gene mit unterschiedlicher Reaktion auf die IFN γ -LPS Stimulierung von Makrophagen aus den Risiko Haplotyp-Gruppen im Vergleich zu den nicht-risiko Gruppen (erfüllte Signifikanz-Kriterien für differenzielle Expression durch die Stimulierung (FC<-2 bzw. FC>2 und FDR 0,05) sowohl in risiko als auch in nicht-risiko und FC ratio $\leq 0,75$ oder $\geq 1,25$).

a) Gesunde Probanden, hochregulierte Gene

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | RefSeq | risiko | | nicht-risiko | | FC ratio risiko/nicht-risiko |
|-----------------|-----------------------|--------------|--------|----------|--------------|----------|---------------------------------|
| | | | FC* | p-Wert* | FC* | p-Wert* | |
| <i>GP1BA</i> | 3707335 | NM_000173 | 4,98 | 1,25E-12 | 3,04 | 3,08E-09 | 1,64 |
| <i>RCN1</i> | 3325503 | NM_002901 | 4,54 | 1,09E-08 | 3,00 | 2,67E-06 | 1,51 |
| <i>IL12B</i> | 2884301 | NM_002187 | 4,50 | 5,52E-07 | 3,28 | 1,97E-05 | 1,37 |
| <i>OLR1</i> | 3444043 | NM_002543 | 3,80 | 6,99E-06 | 2,78 | 0,00022 | 1,37 |
| <i>CCL20</i> | 2530713 | NM_004591 | 13,37 | 2,95E-16 | 10,12 | 4,52E-15 | 1,32 |
| <i>CXCL1</i> | 2731381 | NM_001511 | 5,65 | 5,41E-12 | 4,38 | 1,67E-10 | 1,29 |
| <i>KCNJ2</i> | 3733275 | NM_000891 | 2,84 | 5,49E-08 | 3,77 | 5,13E-10 | 0,75 |
| <i>BCL2L14</i> | 3405207 | NM_030766 | 3,20 | 3,24E-08 | 4,27 | 4,27E-10 | 0,75 |
| <i>HAPLN3</i> | 3638188 | NM_178232 | 6,08 | 1,74E-14 | 8,12 | 5,01E-16 | 0,75 |
| <i>FAM20A</i> | 3768535 | NM_017565 | 4,77 | 3,28E-16 | 6,44 | 4,41E-18 | 0,74 |
| <i>CYP27B1</i> | 3458819 | NM_000785 | 7,10 | 1,77E-15 | 9,68 | 5,12E-17 | 0,73 |
| <i>GPR84</i> | 3456688 | NM_020370 | 4,94 | 3,52E-15 | 6,73 | 4,87E-17 | 0,73 |
| <i>NDP</i> | 4006280 | NM_000266 | 8,45 | 4,12E-15 | 11,60 | 1,50E-16 | 0,73 |
| <i>CXCL10</i> | 2773958 | NM_001565 | 8,57 | 2,41E-05 | 11,80 | 3,28E-06 | 0,73 |
| <i>MT1A</i> | 3662106 | NM_005946 | 5,37 | 1,47E-11 | 7,38 | 2,96E-13 | 0,73 |
| <i>APOBEC3A</i> | 3945515 | NM_145699 | 3,71 | 7,56E-06 | 5,17 | 2,09E-07 | 0,72 |
| <i>HSD11B1</i> | 2378077 | NM_005525 | 10,25 | 1,71E-14 | 14,33 | 6,98E-16 | 0,71 |
| <i>CP</i> | 2700244 | NM_000096 | 15,80 | 4,57E-13 | 22,77 | 2,59E-14 | 0,69 |
| <i>CASP5</i> | 3389330 | NM_004347 | 2,42 | 3,12E-08 | 3,53 | 2,57E-11 | 0,69 |
| <i>CHI3L2</i> | 2351687 | NM_001025199 | 3,81 | 1,10E-10 | 5,59 | 4,39E-13 | 0,68 |
| <i>MT1M</i> | 3662150 | NM_176870 | 42,26 | 1,17E-18 | 62,61 | 9,69E-20 | 0,67 |
| <i>ANKRD22</i> | 3299469 | NM_144590 | 59,71 | 4,59E-19 | 89,65 | 4,31E-20 | 0,67 |
| <i>HLA-DQA2</i> | 2903258 | NM_020056 | 3,89 | 5,15E-09 | 5,94 | 1,97E-11 | 0,66 |
| <i>MT1E</i> | 3662158 | NM_175617 | 8,14 | 1,78E-10 | 13,04 | 2,21E-12 | 0,62 |
| <i>MT1X</i> | 3662247 | NM_005952 | 4,39 | 2,13E-08 | 7,05 | 8,28E-11 | 0,62 |
| <i>CXCL11</i> | 2773972 | NM_005409 | 13,14 | 1,40E-06 | 21,54 | 7,14E-08 | 0,61 |
| <i>ENPP2</i> | 3150579 | NM_006209 | 3,48 | 1,46E-07 | 5,78 | 2,10E-10 | 0,60 |
| <i>MUCL1</i> | 3416702 | NM_058173 | 2,58 | 0,001348 | 4,78 | 2,96E-06 | 0,54 |
| <i>MT1L</i> | 3662130 | NR_001447 | 6,28 | 4,45E-05 | 16,59 | 6,03E-08 | 0,38 |

*FC und p-Wert sind angegeben für IFN γ -LPS vs. unbehandelt

b) Gesunde Probanden, herunterregulierte Gene

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | RefSeq | risiko | | nicht-risiko | | FC ratio risiko/nicht-risiko |
|------------------|-----------------------|--------------|--------|----------|--------------|----------|---------------------------------|
| | | | FC* | p-Wert* | FC* | p-Wert* | |
| <i>SERPINB2</i> | 3791935 | NM_001143818 | -5,66 | 3,35E-07 | -4,12 | 8,11E-06 | 1,37 |
| <i>F13A1</i> | 2940202 | NM_000129 | -10,36 | 7,59E-08 | -7,94 | 6,07E-07 | 1,30 |
| <i>CNIH3</i> | 2382467 | NM_152495 | -2,27 | 4,41E-07 | -3,01 | 1,96E-09 | 0,75 |
| <i>ARHGAP11A</i> | 3587457 | NM_014783 | -2,04 | 3,84E-07 | -2,70 | 7,52E-10 | 0,75 |
| <i>CENPK</i> | 2859667 | NM_022145 | -2,18 | 2,74E-07 | -2,89 | 7,91E-10 | 0,75 |
| <i>CD52</i> | 2326463 | NM_001803 | -2,94 | 3,95E-11 | -3,92 | 2,07E-13 | 0,75 |
| <i>SNX24</i> | 2826343 | NM_014035 | -2,33 | 8,32E-11 | -3,11 | 1,26E-13 | 0,75 |
| <i>LIPA</i> | 3299585 | NM_001127605 | -3,08 | 8,81E-10 | -4,12 | 6,78E-12 | 0,75 |
| <i>DLGAP5</i> | 3565663 | NM_001146015 | -2,48 | 1,76E-07 | -3,31 | 9,36E-10 | 0,75 |
| <i>NDC80</i> | 3776139 | NM_006101 | -2,11 | 1,46E-07 | -2,83 | 2,65E-10 | 0,75 |
| <i>LY86</i> | 2893392 | NM_004271 | -3,59 | 7,21E-10 | -4,81 | 8,99E-12 | 0,75 |
| <i>DEPDC1</i> | 2417528 | NM_001114120 | -3,47 | 2,60E-09 | -4,67 | 3,16E-11 | 0,74 |
| <i>NCAPG</i> | 2720251 | NM_022346 | -2,76 | 1,04E-08 | -3,74 | 5,02E-11 | 0,74 |
| <i>STMN1</i> | 2402459 | NM_203401 | -3,67 | 2,75E-14 | -4,99 | 1,76E-16 | 0,74 |
| <i>DHRS9</i> | 2514304 | NM_005771 | -4,44 | 2,08E-10 | -6,03 | 3,65E-12 | 0,74 |
| <i>ANLN</i> | 2997376 | NM_018685 | -4,06 | 2,30E-12 | -5,53 | 2,38E-14 | 0,73 |
| <i>HIST1H1B</i> | 2947073 | NM_005322 | -2,13 | 1,61E-05 | -2,92 | 6,00E-08 | 0,73 |
| <i>MKI67</i> | 3312490 | NM_002417 | -3,16 | 1,37E-09 | -4,36 | 7,70E-12 | 0,73 |
| <i>CEP55</i> | 3258444 | NM_018131 | -2,66 | 7,22E-10 | -3,68 | 1,52E-12 | 0,72 |
| <i>SHCBP1</i> | 3689880 | NM_024745 | -3,49 | 1,23E-10 | -4,90 | 6,29E-13 | 0,71 |
| <i>GATM</i> | 3622386 | NM_001482 | -9,10 | 3,14E-14 | -12,79 | 1,05E-15 | 0,71 |
| <i>FAM111B</i> | 3331903 | NM_198947 | -3,18 | 6,01E-10 | -4,53 | 2,03E-12 | 0,70 |
| <i>LGI2</i> | 2764004 | NM_018176 | -4,22 | 1,40E-09 | -6,00 | 1,40E-11 | 0,70 |
| <i>TPX2</i> | 3881443 | NM_012112 | -2,97 | 6,18E-09 | -4,25 | 1,72E-11 | 0,70 |
| <i>KIF11</i> | 3258168 | NM_004523 | -3,09 | 4,01E-08 | -4,44 | 1,70E-10 | 0,70 |
| <i>CD9</i> | 3402315 | NM_001769 | -6,29 | 1,22E-12 | -9,05 | 1,90E-14 | 0,69 |
| <i>KIAA0101</i> | 3629103 | NM_014736 | -4,20 | 2,06E-09 | -6,10 | 1,65E-11 | 0,69 |
| <i>HS3ST1</i> | 2760869 | NM_005114 | -4,42 | 4,08E-15 | -6,46 | 1,72E-17 | 0,69 |
| <i>DNAJC9</i> | 3294280 | NM_015190 | -2,07 | 2,20E-08 | -3,02 | 3,93E-12 | 0,68 |
| <i>GPR34</i> | 3974948 | NM_001097579 | -11,94 | 1,96E-16 | -17,95 | 4,74E-18 | 0,67 |
| <i>CCNB2</i> | 3595979 | NM_004701 | -2,10 | 1,20E-07 | -3,18 | 1,92E-11 | 0,66 |
| <i>TOP2A</i> | 3756193 | NM_001067 | -2,87 | 1,67E-07 | -4,42 | 2,29E-10 | 0,65 |
| <i>HIST1H3C</i> | 2899102 | NM_003531 | -2,90 | 9,03E-06 | -4,48 | 3,25E-08 | 0,65 |
| <i>TYMS</i> | 3775842 | NM_001071 | -2,79 | 2,25E-09 | -4,32 | 1,22E-12 | 0,65 |
| <i>CDK1</i> | 3248289 | NM_001786 | -3,23 | 3,80E-09 | -5,04 | 4,48E-12 | 0,64 |
| <i>RRM2</i> | 2469252 | NM_001165931 | -5,25 | 1,70E-10 | -8,51 | 6,36E-13 | 0,62 |
| <i>ENC1</i> | 2862696 | NM_003633 | -3,42 | 1,49E-10 | -5,60 | 8,65E-14 | 0,61 |
| <i>FABP4</i> | 3142381 | NM_001442 | -10,65 | 6,18E-11 | -18,44 | 6,25E-13 | 0,58 |

*FC und p-Wert sind angegeben für IFN γ -LPS vs. unbehandelt

c) HI-Patienten, hochregulierte Gene

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | RefSeq | risiko | | nicht-risiko | | FC ratio risiko/nicht-risiko |
|------------|-----------------------|--------------|--------|----------|--------------|----------|---------------------------------|
| | | | FC* | p-Wert* | FC* | p-Wert* | |
| CCR7 | 3756319 | NM_001838 | 6,82 | 2,20E-31 | 3,78 | 5,54E-21 | 1,80 |
| SERPINB7 | 3791896 | NM_003784 | 10,12 | 7,19E-29 | 5,75 | 4,06E-21 | 1,76 |
| IL31RA | 2810055 | NM_139017 | 6,96 | 1,79E-32 | 4,13 | 2,88E-23 | 1,68 |
| UBD | 2947877 | NM_006398 | 8,75 | 2,93E-29 | 5,36 | 4,99E-22 | 1,63 |
| GBP5 | 2422035 | NM_052942 | 28,72 | 3,36E-39 | 17,60 | 6,24E-34 | 1,63 |
| GPR174 | 3982612 | NM_032553 | 4,33 | 6,58E-18 | 2,77 | 4,88E-11 | 1,56 |
| GPR171 | 2701018 | NM_013308 | 3,59 | 4,54E-18 | 2,30 | 3,50E-10 | 1,56 |
| C17orf87 | 3742627 | NM_207103 | 4,19 | 8,52E-17 | 2,73 | 2,19E-10 | 1,54 |
| CXCL10 | 2773958 | NM_001565 | 12,80 | 2,97E-13 | 8,56 | 1,86E-10 | 1,50 |
| GBP4 | 2421995 | NM_052941 | 27,95 | 6,56E-42 | 18,71 | 1,77E-37 | 1,49 |
| RAB30 | 3384321 | NM_014488 | 3,02 | 1,81E-28 | 2,05 | 3,38E-17 | 1,47 |
| RASGRP1 | 3618736 | NM_005739 | 7,36 | 2,35E-43 | 5,05 | 4,07E-36 | 1,46 |
| EDN1 | 2895244 | NM_001955 | 4,15 | 2,39E-23 | 2,85 | 4,69E-16 | 1,45 |
| TNFSF10 | 2705706 | NM_003810 | 4,36 | 4,55E-19 | 3,01 | 4,50E-13 | 1,45 |
| INHBA | 3047581 | NM_002192 | 17,60 | <E-50 | 12,44 | 5,32E-42 | 1,41 |
| CXCL11 | 2773972 | NM_005409 | 11,18 | 2,54E-12 | 8,01 | 5,12E-10 | 1,40 |
| PLA1A | 2638077 | NM_015900 | 4,21 | 1,52E-24 | 3,05 | 3,91E-18 | 1,38 |
| BCL2L14 | 3405207 | NM_030766 | 2,91 | 2,32E-25 | 2,12 | 1,28E-16 | 1,37 |
| APOL4 | 3959388 | NM_030643 | 3,91 | 1,67E-23 | 2,88 | 3,11E-17 | 1,36 |
| GZMK | 2809793 | NM_002104 | 4,65 | 4,28E-18 | 3,41 | 1,65E-13 | 1,36 |
| RARRES3 | 3333899 | NM_004585 | 5,22 | 3,26E-25 | 3,84 | 8,02E-20 | 1,36 |
| GPR109A | 3475782 | NM_177551 | 7,01 | 2,44E-21 | 5,17 | 2,71E-17 | 1,36 |
| CCL19 | 3204285 | NM_006274 | 49,71 | 4,49E-39 | 36,69 | 2,47E-36 | 1,35 |
| RHOH | 2724671 | NM_004310 | 3,29 | 4,84E-20 | 2,45 | 6,54E-14 | 1,34 |
| LAMA3 | 3781794 | NM_198129 | 3,14 | 2,17E-28 | 2,36 | 1,75E-20 | 1,33 |
| IL12B | 2884301 | NM_002187 | 12,30 | 2,92E-28 | 9,25 | 8,74E-25 | 1,33 |
| CD2 | 2353669 | NM_001767 | 3,61 | 1,52E-19 | 2,74 | 2,48E-14 | 1,32 |
| CYP3A7 | 3063463 | NM_000765 | 14,54 | <E-50 | 11,10 | 4,27E-43 | 1,31 |
| IRF1 | 2875348 | NM_002198 | 9,97 | <E-50 | 7,66 | 9,66E-42 | 1,30 |
| IDO2 | 3095257 | NM_194294 | 9,29 | <E-50 | 7,15 | 2,49E-43 | 1,30 |
| HIST2H2BE | 2434124 | NM_003528 | 2,64 | 5,68E-21 | 2,05 | 3,08E-14 | 1,29 |
| GBP3 | 2421843 | NM_018284 | 5,11 | 7,59E-40 | 3,96 | 3,65E-34 | 1,29 |
| SLAMF1 | 2440327 | NM_003037 | 7,63 | 4,25E-31 | 5,93 | 4,32E-27 | 1,29 |
| SLCO5A1 | 3139580 | NM_030958 | 3,54 | 4,49E-25 | 2,75 | 2,61E-19 | 1,29 |
| IL7R | 2806468 | NM_002185 | 15,57 | 2,84E-23 | 12,19 | 7,42E-21 | 1,28 |
| GPR109B | 3475794 | NM_006018 | 11,17 | 3,60E-23 | 8,88 | 1,36E-20 | 1,26 |
| SYNE2 | 3539724 | NM_182914 | 2,69 | 8,83E-20 | 2,14 | 4,19E-14 | 1,26 |
| IL2RA | 3275729 | NM_000417 | 45,51 | 2,26E-36 | 36,25 | 2,41E-34 | 1,26 |
| C21orf91 | 3926138 | NM_001100420 | 3,11 | 2,90E-21 | 2,48 | 3,88E-16 | 1,25 |
| KLRD1 | 3404660 | NM_002262 | 2,77 | 4,62E-13 | 2,21 | 3,11E-09 | 1,25 |
| CD274 | 3161082 | NM_014143 | 18,51 | 4,30E-41 | 14,87 | 2,15E-38 | 1,25 |
| CD300E | 3770345 | NM_181449 | 3,24 | 5,47E-10 | 4,30 | 1,85E-13 | 0,75 |
| LILRB1 | 3841574 | NM_006669 | 2,99 | 2,80E-18 | 3,99 | 3,57E-24 | 0,75 |

| | | | | | | | |
|-----------------|---------|--------------|-------|----------|-------|----------|-------------|
| <i>CRIM1</i> | 2477073 | NM_016441 | 3,38 | 6,47E-18 | 4,53 | 3,10E-23 | 0,75 |
| <i>CXCL2</i> | 2773434 | NM_002089 | 3,60 | 2,24E-14 | 4,83 | 9,24E-19 | 0,75 |
| <i>CCL7</i> | 3718177 | NM_006273 | 4,59 | 6,19E-19 | 6,24 | 1,43E-23 | 0,74 |
| <i>FPR1</i> | 3869237 | NM_002029 | 3,71 | 1,56E-20 | 5,05 | 3,41E-26 | 0,73 |
| <i>MMP14</i> | 3528864 | NM_004995 | 3,85 | 7,43E-35 | 5,29 | 4,16E-42 | 0,73 |
| <i>CXCL6</i> | 2731350 | NM_002993 | 4,51 | 6,23E-14 | 6,22 | 6,53E-18 | 0,73 |
| <i>S100A8</i> | 2435989 | NM_002964 | 10,76 | 1,20E-24 | 14,83 | 2,69E-28 | 0,73 |
| <i>NDP</i> | 4006280 | NM_000266 | 7,60 | 2,85E-25 | 10,48 | 1,38E-29 | 0,72 |
| <i>IL1B</i> | 2571510 | NM_000576 | 61,23 | <E-50 | 86,60 | <E-50 | 0,71 |
| <i>ADM</i> | 3320123 | NM_001124 | 2,76 | 2,94E-17 | 3,92 | 1,16E-24 | 0,70 |
| <i>SH3PXD2B</i> | 2887164 | NM_001017995 | 3,06 | 1,12E-19 | 4,36 | 5,11E-27 | 0,70 |
| <i>MT1E</i> | 3662158 | NM_175617 | 18,53 | 2,85E-20 | 26,44 | 3,23E-23 | 0,70 |
| <i>CLEC4E</i> | 3443183 | NM_014358 | 8,01 | 1,70E-25 | 11,49 | 3,18E-30 | 0,70 |
| <i>CCL4</i> | 3718930 | NM_002984 | 8,88 | 1,62E-25 | 12,78 | 4,65E-30 | 0,70 |
| <i>CH25H</i> | 3299578 | NM_003956 | 2,40 | 4,47E-11 | 3,47 | 9,61E-18 | 0,69 |
| <i>SGPP2</i> | 2529421 | NM_152386 | 3,05 | 5,48E-19 | 4,46 | 1,00E-26 | 0,68 |
| <i>MT1A</i> | 3662106 | NM_005946 | 11,00 | 4,23E-23 | 16,64 | 1,42E-27 | 0,66 |
| <i>IL8</i> | 2731332 | NM_000584 | 27,47 | 6,48E-42 | 41,87 | <E-50 | 0,66 |
| <i>CCL2</i> | 7385547 | NM_002982 | 2,24 | 1,49E-09 | 3,46 | 3,44E-17 | 0,65 |
| <i>MT1G</i> | 3692999 | NM_005950 | 8,16 | 3,78E-23 | 12,70 | 1,45E-28 | 0,64 |
| <i>VCAN</i> | 2818517 | NM_004385 | 3,33 | 1,73E-07 | 5,29 | 8,07E-12 | 0,63 |
| <i>TNIP3</i> | 2783916 | NM_001128843 | 16,24 | 4,11E-32 | 25,93 | 3,45E-37 | 0,63 |
| <i>OLR1</i> | 3444043 | NM_002543 | 3,40 | 2,04E-12 | 5,48 | 4,49E-19 | 0,62 |
| <i>CXCL5</i> | 2773369 | NM_002994 | 14,04 | 4,73E-28 | 22,95 | 2,46E-33 | 0,61 |
| <i>SLC7A11</i> | 2786322 | NM_014331 | 2,38 | 2,74E-09 | 4,10 | 5,64E-18 | 0,58 |
| <i>ENPP2</i> | 3150579 | NM_006209 | 6,25 | 2,77E-13 | 10,95 | 8,34E-19 | 0,57 |
| <i>CCL8</i> | 3718191 | NM_005623 | 37,06 | 8,46E-30 | 76,24 | 1,32E-35 | 0,49 |

FC und p-Wert sind angegeben für IFN γ -LPS vs. unbehandelt

d) HI-Patienten, herunterregulierte Gene

| Gen-Symbol | Transcript Cluster ID | RefSeq | risiko | | nicht-risiko | | FC ratio risiko/nicht-risiko |
|-----------------|-----------------------|--------------|--------|----------|--------------|----------|------------------------------|
| | | | FC* | p-Wert* | FC* | p-Wert* | |
| <i>LPL</i> | 3088486 | NM_000237 | -3,38 | 3,13E-17 | -2,16 | 3,00E-09 | 1,56 |
| <i>KIAA0101</i> | 3629103 | NM_014736 | -4,01 | 3,58E-13 | -2,61 | 7,69E-08 | 1,54 |
| <i>FABP4</i> | 3142381 | NM_001442 | -5,36 | 3,02E-17 | -3,49 | 1,26E-11 | 1,54 |
| <i>RRM2</i> | 2469252 | NM_001165931 | -4,66 | 4,04E-12 | -3,08 | 8,59E-08 | 1,51 |
| <i>CD36</i> | 3010503 | NM_001001548 | -4,03 | 5,16E-32 | -2,75 | 1,03E-22 | 1,46 |
| <i>CCNE2</i> | 3145107 | NM_057749 | -3,17 | 4,14E-13 | -2,19 | 1,35E-07 | 1,45 |
| <i>GPC4</i> | 4022370 | NM_001448 | -2,99 | 3,69E-16 | -2,09 | 1,95E-09 | 1,43 |
| <i>MSR1</i> | 3125571 | NM_002445 | -3,16 | 3,92E-17 | -2,24 | 1,22E-10 | 1,41 |
| <i>SPARC</i> | 2882098 | NM_003118 | -3,03 | 5,17E-25 | -2,16 | 4,78E-16 | 1,40 |
| <i>PHLDA1</i> | 3462816 | NM_007350 | -2,85 | 3,94E-22 | -2,04 | 1,44E-13 | 1,40 |
| <i>CXADR</i> | 3915479 | NM_001338 | -3,55 | 1,04E-07 | -2,56 | 4,72E-05 | 1,39 |
| <i>AGPAT9</i> | 2734047 | NM_032717 | -3,26 | 2,84E-15 | -2,36 | 6,78E-10 | 1,38 |

| | | | | | | | |
|-----------------|---------|--------------|--------|----------|--------|----------|-------------|
| <i>FAM111B</i> | 3331903 | NM_198947 | -3,02 | 1,16E-10 | -2,26 | 6,25E-07 | 1,34 |
| <i>ATP8B4</i> | 3623552 | NM_024837 | -3,79 | 7,20E-23 | -2,87 | 3,31E-17 | 1,32 |
| <i>CDK1</i> | 3248289 | NM_001786 | -3,02 | 1,22E-12 | -2,30 | 1,69E-08 | 1,31 |
| <i>PAQR5</i> | 3599758 | NM_001104554 | -2,75 | 1,60E-20 | -2,10 | 9,15E-14 | 1,31 |
| <i>ATP6V0D2</i> | 3105749 | NM_152565 | -6,12 | 6,23E-25 | -4,73 | 6,90E-21 | 1,29 |
| <i>MMD</i> | 3763270 | NM_012329 | -3,22 | 3,03E-30 | -2,49 | 4,03E-23 | 1,29 |
| <i>SEPP1</i> | 2855285 | NM_001093726 | -59,89 | <E-50 | -46,45 | <E-50 | 1,29 |
| <i>C13orf15</i> | 3486956 | NM_014059 | -3,67 | 1,30E-17 | -2,85 | 3,01E-13 | 1,29 |
| <i>CD109</i> | 2913694 | NM_133493 | -4,22 | 2,38E-23 | -3,28 | 1,49E-18 | 1,29 |
| <i>GPR183</i> | 3522662 | NM_004951 | -4,61 | 4,77E-31 | -3,59 | 9,99E-26 | 1,28 |
| <i>FGD4</i> | 3410614 | NM_139241 | -2,62 | 1,48E-19 | -2,04 | 2,79E-13 | 1,28 |
| <i>CD9</i> | 3402315 | NM_001769 | -5,15 | 7,72E-35 | -4,05 | 8,62E-30 | 1,27 |
| <i>GPR34</i> | 3974948 | NM_001097579 | -10,92 | 4,31E-32 | -8,58 | 8,26E-29 | 1,27 |
| <i>SHCBP1</i> | 3689880 | NM_024745 | -2,91 | 1,08E-14 | -2,30 | 1,93E-10 | 1,27 |
| <i>METTL7A</i> | 3414739 | NM_014033 | -3,65 | 9,84E-35 | -2,90 | 1,51E-28 | 1,26 |
| <i>TNFRSF21</i> | 2956052 | NM_014452 | -2,62 | 7,75E-15 | -2,08 | 3,50E-10 | 1,26 |
| <i>FLRT2</i> | 3546924 | NM_013231 | -2,60 | 1,85E-14 | -2,07 | 6,04E-10 | 1,26 |
| <i>RGS18</i> | 2372719 | NM_130782 | -3,65 | 3,77E-32 | -2,91 | 2,59E-26 | 1,26 |
| <i>SPRY2</i> | 3519309 | NM_005842 | -3,93 | 1,04E-16 | -3,13 | 3,88E-13 | 1,26 |
| <i>MKI67</i> | 3312490 | NM_002417 | -3,28 | 8,18E-20 | -2,61 | 3,97E-15 | 1,25 |
| <i>FUCA1</i> | 2401643 | NM_000147 | -7,42 | 1,40E-44 | -5,92 | 2,27E-40 | 1,25 |
| <i>GAS2L3</i> | 3428268 | NM_174942 | -3,50 | 7,69E-29 | -2,80 | 3,28E-23 | 1,25 |
| <i>PCSK6</i> | 3642200 | NM_002570 | -3,01 | 2,55E-36 | -2,41 | 3,78E-29 | 1,25 |
| <i>F13A1</i> | 2940202 | NM_000129 | -17,13 | 1,49E-19 | -26,48 | 3,64E-23 | 0,65 |
| <i>IGF1</i> | 3468345 | NM_001111283 | -2,96 | 9,67E-12 | -4,68 | 1,17E-18 | 0,63 |

FC und p-Wert sind angegeben für IFN γ -LPS vs. unbehandelt

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Christian Hengstenberg, der es mir ermöglicht hat, dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Vielen Dank für die Betreuung, Korrektur und Begutachtung dieser Arbeit. Frau Prof. Dr. Anja Bosserhoff danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei PD Dr. Klaus Stark möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung im Laboralltag und die Korrektur der Doktorarbeit bedanken.

Prof. Dr. Langmann und den Kollegen am Institut für Humangenetik danke ich für jegliche Unterstützung und die freundliche Aufnahme ins Labor.

Vielen Dank an Prof. Dr. Rehli und die Kollegen der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie für die Ermöglichung der Analyse der DNA-Methylierung.

Ich danke meinen Kollegen Ulrike Esslinger, Maya Fürstenau-Sharp, Nico Jentsch, Melanie Klingenstein, Michaela Schmid, Josef Simon und Martina Zimmermann für den angenehmen gemeinsamen Laboralltag. Ein ganz besonderer Dank gilt Ulli für die tolle Freundschaft und schöne Zeit. Bedanken möchte ich mich auch bei allen weiteren Kollegen der Inneren Medizin II.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern für Ihre Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Christa Zollbrecht

Regensburg, Oktober 2012